

12

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平6-506117

第1部門第1区分

(43) 公表日 平成6年(1994)7月14日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/57			
C 0 9 K 13/00	Z N A	7188-4H	
C 1 2 N 1/19		7236-4B	
15/53			
	9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 51 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平4-509369	(71) 出願人	ザ・ソーク・インスティテュート・バイオ テクノロジー／インダストリアル・アソシ エイツ・インコーポレーテッド アメリカ合衆国カリフォルニア州92037, ラ・ホーラ, コースト・ブールヴァード・ サウス 505
(86) (22) 出願日	平成4年(1992)3月31日	(72) 発明者	グレッソン, マーティン・アンソニー アメリカ合衆国カリフォルニア州92130, サン・ディエゴ, カメル・ケイブ 12458
(85) 翻訳文提出日	平成5年(1993)9月14日	(74) 代理人	弁理士 湯浅 恭三 (外6名)
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 2 / 0 2 5 2 1		
(87) 国際公開番号	W O 9 2 / 1 7 5 9 5		
(87) 国際公開日	平成4年(1992)10月15日		
(31) 優先権主張番号	6 7 8, 9 1 6		
(32) 優先日	1991年4月1日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
(81) 指定国	EP (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F R, G B, G R, I T, L U, M C, N L, S E), A U, C A, J P		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ピキア (Pichia) 蛋白質分解活性に影響する遺伝子およびその使用

(57) 【要約】

ピキア属の種のタンパク分解処理に関係する遺伝子の単離と特性化について述べる。このような遺伝子の利用可能性が、タンパク分解活性の欠損した、タンパク分解感受性組換え産物の発現に宿主として有用であるピキア菌株の発生を可能にしている。ピキア属の種からの他の遺伝子の単離と特性化、並びにそれらの用途についても述べる。

請求の範囲

1. ビヒア属の菌株から得られる単離DNAフラグメントであって、直接又は間接的に前記菌株のタンパク分解活性に影響を及ぼすタンパク質をコードする遺伝子を含むDNAフラグメント。
 2. 前記タンパク質が前記菌株のカルボキシペプチダーゼY活性に影響を及ぼす請求項1記載のDNAフラグメント。
 3. 前記遺伝子が図面の図1の制限地図を有する請求項2記載のDNAフラグメント。
 4. 前記フラグメントがプラスミドpEP202の約1.8kbp EcoRIフラグメントである請求項2記載のDNAフラグメント。
 5. 前記フラグメントが、前記菌株のカルボキシペプチダーゼY活性に影響を及ぼすタンパク質をコードする、プラスミドpEP301の約2.7kbp EcoRI-SacIフラグメント又はその部分である請求項2記載のDNAフラグメント。
 6. 前記遺伝子の前記核酸配列が配列ID No. 2に記載されるアミノ酸配列と実質的に同じであるアミノ酸配列をコードする請求項2記載のDNAフラグメント。
 7. 前記遺伝子の核酸配列が配列ID No. 1に記載される核酸配列と実質的に同じである請求項2記載のDNAフラグメント。
 8. 請求項1記載の遺伝子の改変形を含む単離DNAフラグメントであって、前記改変が遺伝子の機能産物の産生を不能にし、前記菌株のタンパク分解活性に影響を及ぼす、遺伝子産物の能力を変化させるDNAフラグメント。
 9. 前記遺伝子の改変形が相対的組換えによるビヒア属の酵母宿主中への導入に適する請求項8記載のDNAフラグメントであって、その表現産物がタンパク分解活性に影響を及ぼす前記遺伝子の特定座において相対的組換えが生ずるDNAフラグメント。
 10. 改変遺伝子が、その非改変形において、前記菌株のカルボキシペプチダーゼY活性に影響を及ぼすタンパク質をコードする請求項8記載のDNAフラグメント。
- p20から選択される請求項20記載の菌株。
22. 前記宿主菌株がヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子、アルギニノスクシネート リアーゼ遺伝子、又はオロチジン5'-ホスフェートデカルボキシルーゼ遺伝子から選択される少なくとも1種の栄養要求性マーカー遺伝子を欠き、前記フラグメントの改変遺伝子が宿主菌株に欠けている栄養要求性マーカー遺伝子の完全形のその中への挿入によって改変される請求項16記載の方法。
 23. 請求項22記載の方法によって生成されるタンパク分解活性の欠損したビヒア菌株。
 24. プロテイナーゼA活性とカルボキシペプチダーゼ活性との欠損した請求項23記載の菌株。
 25. P. バストリスの菌株p1、p2、p5、p8、p13、p16又はp20から選択される請求項24記載の菌株。
 26. 遺伝子の前記フラグメントがそれからの欠失の生成によって改変される請求項16記載の方法。
 27. 前記宿主菌株がGS115であり、前記DNAフラグメントがプラスミドpDR401の約5.3kbp SacI-EcoRIフラグメントである請求項22記載の方法。
 28. ビヒア属の野生型菌株に比べて、タンパク分解活性の欠損したビヒア属の酵母細胞。
 29. プロテイナーゼA活性とカルボキシペプチダーゼ活性との欠損した請求項28記載の酵母細胞。
 30. タンパク分解感受性組換え産物の表現方法であって、前記産物をコードするDNAによって請求項28記載の細胞を形質転換させ、前記細胞を前記タンパク分解感受性産物が表現されるような条件下で培養することを含む方法。
 31. 表現時に、前記宿主生物のカルボキシペプチダーゼ活性に直接又は間接的に影響を及ぼすタンパク質をコードする細胞の遺伝子を、前記宿主菌株の栄養要求性表現型を補足するマーカー遺伝子の挿入によって改変される前記遺伝子の欠失形によって組換えることによって、細胞のタンパク分解活性を欠損させ、かつマーカー遺伝子をヒスチノールデヒドロゲナーゼ遺伝子、アルギニノスク

11. 前記遺伝子がその中への栄養要求性マーカー遺伝子の挿入によって改変される請求項9記載のDNAフラグメント。
12. 前記栄養要求性マーカー遺伝子がビヒアもしくはサッカロミセスHIS4遺伝子、ビヒアもしくはサッカロミセスARG4遺伝子、又はビヒアもしくはサッカロミセスURA3遺伝子から選択される請求項11記載のDNAフラグメント。
13. 前記フラグメントがプラスミドpDR401中に含まれる請求項12記載のDNAフラグメント。
14. 前記遺伝子がそれからの欠失の生成によって改変される請求項9記載のDNAフラグメント。
15. 前記フラグメントがプラスミドpDR421中に含まれる請求項14記載のDNAフラグメント。
16. ビヒア属の宿主菌株に比べて、タンパク分解活性の欠損したビヒア属菌株の形成方法であって、前記宿主菌株を請求項8記載のDNAフラグメントと、前記宿主菌株のゲノム中に前記DNAフラグメントを部位特異的組込みに適した条件下で接触させることを含む、前記部位特異的組込みがタンパク分解活性に影響を及ぼすタンパク質をコードする前記遺伝子の特定座において生ずる方法。
17. 前記接触の結果として得られる菌株を、前記宿主菌株に比べて低いタンパク分解活性を有する菌株の存在に関して検査する工程と；
前記宿主菌株に比べて低いタンパク分解活性を有するような菌株を選択する肯定と
をさらに含む請求項16記載の方法。
18. 前記DNAフラグメントの組込みが前記宿主生物のプロテイナーゼA活性とカルボキシペプチダーゼ活性とに影響を及ぼす請求項16記載の方法。
19. 請求項16記載の方法によって形成されるタンパク分解活性の欠損したビヒア菌株。
20. プロテイナーゼA活性とカルボキシペプチダーゼ活性との欠損した請求項19記載の菌株。
21. P. バストリスの菌株p1、p2、p5、p8、p13、p16又は

シネート リアーゼ遺伝子、又はオロチジン5'-ホスフェートデカルボキシルーゼ遺伝子から選択する請求項30記載の方法。

32. 請求項18記載の方法を用いて宿主菌株のタンパク分解活性を欠損させることを含む、タンパク分解感受性組換え産物の表現方法であって、前記宿主菌株が少なくとも1種の栄養要求性マーカー遺伝子を欠き、かつ前記宿主菌株が転写の読み取りフレーム方向において、下記ヌクレオチド配列：

- (i) メチロトロフ酵母のメタノール反応性遺伝子のプロモーター領域；
- (ii) 本質的に、

- (a) 任意の分泌シグナル配列と、
- (b) タンパク分解感受性タンパク質と

から成るポリペプチドをコードする配列と、
(iii) メチロトロフ酵母中の機能的転写終結因子と、
を有する表現カセットを含む少なくとも1個のDNAフラグメントによって形質転換され、前記配列が前記ポリペプチドをコードする配列の転写に関して作用的に相互に関連する方法。

33. 前記宿主菌株が少なくとも2種の栄養要求性マーカー遺伝子を欠損する請求項32記載の方法。

34. 前記栄養要求性マーカー遺伝子がHIS4遺伝子とURA3遺伝子である請求項33記載の方法。

35. タンパク分解感受性産物がIGF-1であり、IGF-1をコードするDNAによる前記宿主の形質転換に用いられるマーカー遺伝子がHIS4遺伝子である請求項34記載の方法。

36. 宿主をタンパク分解活性欠損にさせるために用いられる改変遺伝子が、その非改変形において、宿主のカルボキシペプチダーゼ活性に影響を及ぼすタンパク質をコードする請求項35記載の方法。

37. 改変遺伝子がコード配列の一部の欠失によって形成される請求項36記載の方法。

38. 前記組換え産物を表現する組換え菌株が菌株M+IMB206S1である請求項37記載の方法。

48. ビヒア パストリス菌株GS4-2521-3/7又はGS4-2521-4/1から選択される請求項47記載の酵母細胞。

組織換体により生産される生成物の蛋白質分解の問題を減少または除去させるために種々の技術が応用できる。例えば、プロテアーゼ活性が阻害されるように組織換体株が増殖する条件を修正することができる。例えばこのことは種々のプロテアーゼ作用を阻害するものに十分なように培地の pH を調節することにより達成される。しかしながら、この方法はある種の組織換体生成物を発現する宿主生物

蛋白質分解活性を欠く S. セレビジエ (cerevisiae) および糸状菌が異種ペアチドの組織化発現に使用されてきた。しかしながら、これらの生物はメチロトーフ酵母 ピキア (Pichia) とは本質的に異なっている。サッカロマイセス (Saccharomyces)、アスペルギルス (Aspergillus) および ピキア (Pichia) 間には多くの代謝的および生理的相違が存在するため、これらの種々の生物の蛋白質分解プロセッシング系は同じである必要はない。実際、ピキア (Pichia) 内に存在する蛋白質分解活性の型に關しては現在ほとんど知られていない。

別の実施態様に従うと、ピキア (*Pichia*) オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ蛋白質 (URA3 遺伝子) をコードしている遺伝子が提供され

る。この遺伝子の有効性は、ピキア (*Pichia*) の株 (Ura⁻) と組合せて、蛋白質分解活性が欠損したピキア (*Pichia*) の組換え株の産生に使用するための選択系が提供されることである。そのような Ura⁻ 株はまた、糖々の異性生成物の組換え発現に使用される組換え DNA 作製物による形質転換の宿主としても有用である。

図面の簡単な説明

図1はピキア (*Pichia*) のカルボキシペプチダーゼY活性に影響するピキア パストリス (*Pichia pastoris*) 遺伝子の制限地図である。

図2はプラスミド pEP202 の制限地図である。

図3はプラスミド pEP205 の制限地図である。

図4はプラスミド pEP301 の制限地図である。

図5はプラスミド pDR401 の制限地図である。

図6はプラスミド pPU201 の制限地図である。

図7はプラスミド pPU202 の制限地図である。

図8はプラスミド pPU203 の制限地図である。

図9はプラスミド pPU205 の制限地図である。

図10はプラスミド pPU206 の制限地図である。

図11はプラスミド pDR421 の制限地図である。

図12はピキア パストリス (*Pichia pastoris*) オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子 (助成、URA3 遺伝子) の制限地図である。

図13は pDR601 および pDR602 の作製に使用された工程を要約している。

図14はプラスミド pDR601 の制限地図である。

図15はプラスミド pDR602 の制限地図である。

図16はプラスミド pDL521 の制限地図である。

図17はピキア パストリス (*Pichia pastoris*) プロテイナーゼBの遺伝子の一部の制限地図である。

図18はプラスミド pDR911 の制限地図である。

ペプチジルアミノペプチダーゼ活性、プロテイナーゼD活性、プロテイナーゼE活性などが含まれる。

本明細書で使用される場合、直接または間接的に酵母株の蛋白質分解活性に影響する蛋白質をコードしている遺伝子には、プロテイナーゼをコードしている遺伝子またはプロテイナーゼに作用する蛋白質をコードしている遺伝子が含まれる。ここに使用される場合、蛋白質に作用する蛋白質とは、プロテイナーゼの活性を変化させるかまたは調節する蛋白質を指している。従って、例えば蛋白質分解活性に直接影響する蛋白質とはプロテイナーゼをコードしている蛋白質であり、蛋白質分解活性に間接的に影響する蛋白質とは蛋白質分解プロセスにより蛋白質を活性化または活性を増加させる蛋白質である。サッカロマイセス セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) プロテイナーゼはサッカロマイセス セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の蛋白質分解活性に直接および間接的に影響を与える蛋白質の例である。

本発明の一つの実施態様に従うと、直接または間接的にピキア (*Pichia*) 属の株のカルボキシペプチダーゼY活性に少なくとも影響を及ぼす蛋白質をコードしているピキア (*Pichia*) 遺伝子がピキア (*Pichia*) 属の一つの種から単離され同定された。この遺伝子は以後便宜上、この遺伝子およびS. セレビジエ (*cerevisiae*) PEP4 遺伝子の間のいくつかの類似性の存在に基づき、ピキア (*Pichia*) PEP4 遺伝子と称される。しかしながら、ピキア (*Pichia*) 遺伝子およびサッカロマイセス (*Saccharomyces*) 遺伝子のヌクレオチド配列は本質的には異なっていることを認識された。この遺伝子をコードしている配列を含む断片は種々の材料から簡単な操作により容易に得ることができる。そのような材料の一つはプラスミド pEP202 (図2参照) の約10.6 Kbp EcoRI断片であり、もしくはプラスミド pEP301 (図4参照) の約2.7 Kbp EcoRI-SacI断片である。

プロテイナーゼA遺伝子をコードしているDNAもまた提供される。本発明の

発明の詳細な説明

本発明に従うと、ピキア (*Pichia*) 属の株の蛋白質分解活性に直接的にまたは間接的に影響する蛋白質をコードしている遺伝子を含む前記の株から得られた単離DNA断片が提供される。

本発明の別の実施態様に従うと、修飾されていない同じ種の宿主株に比較して蛋白質分解活性が欠失しているピキア (*Pichia*) 属の修飾株を作り出す方法が提供される。その方法は：

前記宿主株を上記遺伝子の修飾型 (前記修飾はその遺伝子を機能的生成物が産生できないようにするか、または蛋白質分解活性に影響する遺伝子生成物の能力を変化させる) と接触させる (ここで前記の接触は前記宿主株のゲノム内への上記遺伝子の上記修飾型の部位特異的組込みに通じた条件下で実施され、前記部位特異的組込みは、蛋白質分解活性に影響する前記蛋白質をコードしている前記遺伝子の特定の座位で起こる) ことを含んでいる。

本発明のさらに別の実施態様に従うと、蛋白質分解活性が欠失したピキア (*Pichia*) 属の株が提供される。そのような株は色々な方法で産生できるが、現在そのような株を産生する良好な方法は上記の方法である。

本発明のさらに別の実施態様に従うと、蛋白質分解感受性組換え生成物の発現方法が提供され、前記方法は、前記蛋白質分解感受性生成物を蛋白質分解活性が欠失している上記ピキア (*Pichia*) 細胞中で発現させることを含んでいる。

本発明のさらに別の実施態様に従うと、オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子を含むピキア (*Pichia*) 属株から得られた単離DNA断片が提供される。

本発明のさらに別の実施態様に従うと、組換えDNA作製物を形質転換できる宿主としてのピキア (*Pichia*) 属の酵母細胞が提供される (前記宿主はオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子が欠失している)。

本明細書で使用される術語「蛋白質分解活性」とは、蛋白質分解経路に含まれる酵素により示される1つまたはそれ以上の酵素活性を指している。蛋白質分解活性には、プロテイナーゼA活性、プロテイナーゼB活性、カルボキシペプチダーゼY活性、カルボキシペプチダーゼS活性、アミノペプチダーゼC活性、ジ

プロテイナーゼA遺伝子は配列番号2に示したアミノ酸配列を参照することによりさらに特徴付けできる。配列番号2に示されたものと本質的に同一のアミノ酸配列をコードしている任意の核酸配列を持つDNA、または相同的遺伝子の破壊のために有用であるような十分な相同性を持つDNAも本発明の實施に使用できる。上記のアミノ酸配列をコードしている核酸の例は配列番号1に示されている。

ピキア (*Pichia*) 属の株の蛋白質分解活性に直接または間接的に影響を及ぼす蛋白質をコードしているピキア (*Pichia*) 遺伝子は、遺伝子の機能的生成物を産生できないようにするため、または前記ピキア (*Pichia*) 株の蛋白質分解活性に影響を及ぼす遺伝子産物の能力を変化させるために種々の方法により修飾できる。当業者は上記遺伝子の修飾のために多くの方法があることを認めるであろう。例えば、遺伝子によりコードされている蛋白質のアミノ酸配列を修飾するためにコード配列に突然変異を起こすことができる。もしくは、コード配列の種々の部分を遺伝子から欠失させることができる。欠失は発現された生成物を非機能的にするだけで十分である (たとえまだそれが発現できていても)。従って、たった一つのヌクレオチドが欠失されても、残りのコード配列を読み取らねばならずことにより、たとえ発現できていても生成物の機能を失わせることができる。もちろん、より大きな欠失は本質的に修飾された生成物を発現するようにでき、およびそのような生成物は、無数の遺伝子により産生される生成物と比較して非常に異なる蛋白質分解活性を持っているであろう (もしあったとしても)。さらに別の方法としては、問題とする遺伝子の読み枠を破壊するようにコード配列内へ追加の配列を挿入でき、それにより、発現される生成物は劇的に変えられ、または完全に発現されなくなるであろう。

ピキア (*Pichia*) 属の株の蛋白質分解活性に直接または間接的に影響を及ぼす蛋白質をコードしているピキア (*Pichia*) 遺伝子の修飾に特に都合の良い方法は前記ピキア (*Pichia*) 遺伝子内へ独立発現性のマーカー遺伝子を挿入し、それによりピキア (*Pichia*) 遺伝子を破壊することである。そのような独立発現性マーカー遺伝子はピキア (*Pichia*) またはサッカロマイセス (*Saccharomyces*) HIS4遺伝子、ピキア (*Pichia*) またはサッカロマイセス (*Saccharomyces*) ARG4遺伝子、

ピキア (Pichia) または サッカロマイセス (Saccharomyces) URA3 遺伝子などから選択できる。

蛋白質分解活性を欠く ピキア (Pichia) 株は種々の方法により調製できる。現在のところ好適な方法は、適した宿主中、本発明の遺伝子 (この遺伝子は修飾されていない形で ピキア (Pichia) 属の株の蛋白質分解活性に、直接または間接的に影響を及ぼす蛋白質をコードしている) を修飾することから成る。もしくは、宿主株に無作為的な (即ち非選択的) 突然変異を起こさせ、蛋白質分解活性を欠く突然変異体を選択するためにスクリーニングを行う。

宿主中、本発明の遺伝子を修飾させることにより蛋白質分解活性欠失株が産生される場合、そのような修飾は例えば、蛋白質分解活性に影響する蛋白質をコードしている遺伝子 (即ち標的遺伝子) の特定の部位での宿主のゲノム内の修飾遺伝子の部位特異的組込みに適した形質転換条件下で修飾遺伝子を導入することにより実施される。組込みは宿主の内在性遺伝子を置き換えまたは修飾するであろう。酵母宿主の標的座位内への修飾遺伝子の導入に都合の良い方法は宿主内の天然の遺伝子の2つの別々の相間的な末端を持つ直鎖状DNA断片中に修飾遺伝子を包含させることである。こうすれば形質転換により、その発現生成物が蛋白質分解活性に影響を与える遺伝子の特定の部位で相間的組換えを起こすように方向付けられるであろう。

蛋白質分解活性を欠く ピキア (Pichia) 株は上に記したような (即ち、その発現生成物が蛋白質分解活性に影響する遺伝子の特定の部位での部位特異的組込みに、本発明の修飾遺伝子を通した宿主内へ導入し、それにより、すべてまたは一部の修飾遺伝子で内在性遺伝子のすべてまたは一部を置き換える) 好適な方法で調製され、内在性遺伝子は破壊されているであろう。

ここで使用される場合、新遺伝子“破壊”とは機能性生成物が生じないか、または変化した機能を持つ生成物を得るように遺伝子を最終的に生じさせる標的座位の操作を意味している。従って、付加された配列の存在 (例えば独立栄養性マーカーの導入または読み枠のシフトを起こす配列の導入により)、標的遺伝子からのヌクレオチドの消失 (例えば欠失により)、または標的遺伝子の他の突然変異により破壊をおこなうことができる。蛋白質分解活性を欠く ピキア (Pichia)

るために一つまたはそれ以上の欠損を持つことができる。

ピキア (Pichia) 株の蛋白質分解活性に直接または間接的に影響する蛋白質をコードしている遺伝子の修飾形での形質転換に使用される好適な宿主は、少くとも一つの独立栄養性マーカー遺伝子が欠失した株である。そのような宿主を本発明の修飾形および独立栄養性マーカー遺伝子で同時形質転換することにより形質転換DNAが取り込まれた (従って宿主の蛋白質分解活性に直接または間接的に影響する蛋白質をコードしている遺伝子の破壊形を持っているはずである) 株の迅速な選択が可能になるため、前記の宿主生物の使用が好適である。

本発明の実施に有用な独立栄養性マーカー遺伝子の例としては (即ち、使用される好適な宿主株に欠損しているマーカー遺伝子) ヒスチジノール デヒドロゲナーゼ遺伝子、アルギニノスクシネート リアーゼ遺伝子、またはオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子などが挙げられる。そのような宿主株が ピキア (Pichia) の形質転換に用いられた場合、上記の修飾遺伝子 (直鎖状DNA断片に含まれている) は、好適には宿主株が欠失している独立栄養性マーカー遺伝子の無偏の形と会合する (例えば独立栄養性マーカー遺伝子の各々は修飾遺伝子内に含まれているかまたは形質転換用直鎖状DNA断片上の修飾遺伝子の5' または3' に位置している)。本発明の実施での使用が企図されている宿主株の例としては、HIS-4 欠失 ピキア (Pichia) 株、GS115 (ATCC 20864)、ARG-4 欠失 ピキア (Pichia) 株、GS190、HIS-4/URA3 欠失 ピキア (Pichia) 株、GS4-2、HIS4/ARG4 欠失 ピキア (Pichia) 株 PPF1 (NRRL Y-18017; 米国特許第4,812,405号参照) などが挙げられる。ヒスチジノール デヒドロゲナーゼをコードしている機能性遺伝子が挿入されている上記修飾遺伝子を含むDNA断片は、例えば、プラスミド pDR401 の約5.3 Kbp SacI-EcoRI断片から得ることができる。上記遺伝子の修飾形を含むDNA断片 (オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼをコードしている機能性遺伝子の5' に位置している) の別の断片は、例えば、プラスミド pDR421 の約5.0 Kbp BglII断片から得ることができる。

蛋白質分解活性を欠く ピキア (Pichia) 株の特に都合のよい応用例は、

ピキア (Pichia) 株を調製する好適な方法では遺伝子付加、遺伝子置換またはここで“ポップ-イン-ポップ-アウト”と称される付加および置換の組合せにより遺伝子破壊が達成される。遺伝子置換においては内在性標的遺伝子が標的座位から物理的に除去され、修飾遺伝子と置換される。このことは、標的遺伝子の5' および3' の各々の末端と相間的な末端を持つ直鎖状断片で宿主を形質転換することにより達成される。遺伝子付加では内在性標的遺伝子へ形質転換DNAが付加される。形質転換DNAの修飾遺伝子が変形される方法に依存して、遺伝子付加により標的遺伝子の二つの非機能的コピーまたは標的遺伝子の一つの機能的および一つの非機能的コピーが生じる可能性がある。二つのコピーの各々が内在性遺伝子の一部および形質転換DNAの一部から成り立っている。もし、遺伝子付加後に標的遺伝子の一つの機能的コピーが残っていたら、残っている標的遺伝子の二つのコピー間による相間的組換えによりそれを除去することができる。相間的組換えへと続く遺伝子付加の組合せ過程はポップ-イン-ポップ-アウト過程である。

ピキア (Pichia) 属の酵母を形質転換する方法ならびにそのような酵母細胞の培養に適用できる方法は本分野では一般的なものである。上記の修飾遺伝子を含む構成物は、Cregg et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5: 3376 (1985) および米国特許第4,879,231号により記載されているスフェロプラスト技術または ピキア (Pichia) に適応させるために修正された [欧州特許出願第312,934号参照; 米国特許第4,929,535号も利用できる] 全細胞増殖リチウム酵母形質転換系 [Ito et al., *Agric. Biol. Chem.*, 48: 341 (1984)] により ピキア (Pichia) 細胞を形質転換する。スフェロプラストの発生および維持を必要としないので、しばしば全細胞増殖リチウム法が便利である。スフェロプラスト法は一般的に形質転換の効率がより良い手段であるので、本発明の目的にはスフェロプラスト法が好適である。

上記の修飾遺伝子により形質転換される宿主 ピキア (Pichia) 株は野生型 ピキア (Pichia) 細胞であり、蛋白質分解経路の欠失遺伝子による形質転換により、減少した蛋白質分解活性でスクリーニングできることを当業者は認識するであろう。用いられる宿主株は所望の形質転換体の同定および選択を助け

例えば表皮増殖因子 (EGF)、成長ホルモン放出因子 (GRF)、インシュリン様増殖因子-1 (IGF-1) などのような蛋白質分解感受性組換え生成物の発現である。蛋白質分解活性を欠く組換え ピキア (Pichia) 株で発現された場合、宿主生物の蛋白質分解能力が修飾されているため、生じる組換え生成物のうける蛋白質分解活性のレベルは低い。

蛋白質分解感受性生成物産生のための蛋白質分解欠失 ピキア (Pichia) 発現系は種々の方法により作ることができる。例えば ピキア (Pichia) 宿主株は上記のごとく蛋白質分解欠損にでき、次にさらに問題とする異種蛋白質 (特に蛋白質分解感受性蛋白質) をコードしているDNAで形質転換される。もしくは、問題とする異種蛋白質をコードしているDNAをすでに有する (bearing) 組換え ピキア (Pichia) 株を後から例えば上記のように蛋白質分解を欠失させるようにできる。さらに別の例では、ピキア (Pichia) 株は上記の修飾遺伝子および問題とする異種の蛋白質分解感受性蛋白質をコードしているDNAで同時形質転換できた。

ペプチド生成物の組換え発現においての宿主株としての ピキア (Pichia) 属の株の使用は以前に非常に詳細に記述されている。本発明の実施における使用のために現在のところ好適な酵母種は、唯一の炭素源およびエネルギー源としてメタノールを効率よく利用できる既知の工業的酵母種の ピキア パストリス (Pichia pastoris) である。

メタトロフ酵母には多数のメタノール応答性遺伝子があり、各々の発現はメタノール応答性制御領域 (プロモーターとも称される) により制御されている。そのようなメタノール応答性プロモーターは本発明の実施においての使用にも適している。特別の制御領域の例としては、ピキア パストリス (Pichia pastoris) AOX1 からプライマリー アルコールオキシダーゼ遺伝子のためのプロモーター、P. パストリス (pastoris) AOX2 (P. パストリス (pastoris)) は二つの機能的なアルコールオキシダーゼ遺伝子を含んでいることが知られている: アルコール オキシダーゼ I (AOX1) およびアルコール オキシダーゼ II (AOX2); 二つの AOX 遺伝子のコード部分はDNAおよび予測されるアミノ酸配列の両方のレベルで非常に相間的であ

り、共通の制限部位を共有している；二つの遺伝子から発現される蛋白質は類似の酵素性質を持っているがAOX1のプロモーターはより効率的であり、その遺伝子産物はしばしばより多く発現される]からのセカンダリー アルコール オキシダーゼ遺伝子のためのプロモーター、P. パストリス (pastoris) からのジヒドロキシセトン シンターゼ遺伝子 (DAS) のためのプロモーター、P. パストリス (pastoris) からのP40遺伝子のためのプロモーター、P. パストリス (pastoris) からのカタラーゼ遺伝子のためのプロモーター、P. パストリス (pastoris) からのアルデヒド デヒドロゲナーゼ遺伝子のためのプロモーター、P. パストリス (pastoris) からの置換デヒドロゲナーゼ遺伝子のためのプロモーターなどが挙げられる。

現在のところ、P. パストリス (pastoris) 宿主において、蛋白質分解感受性生成物をコードする遺伝子の発現の制御のための好適なプロモーター領域はP. パストリス (pastoris) のメタノール制御プライマー アルコール オキシダーゼ遺伝子のプロモーターである。プロモーターを含むAOX1遺伝子は単離され、十分に特異付けられている；Ellis et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5:1111 (1985) および米国特許第4, 855, 231号参照。

組み換え蛋白質発現体の発生のためにピキア (*Pichia*) 細胞の形質転換に使用される現在好適な発現カセットは、転写の読み枠の方向に、以下のDNA配列を含んでいる：

- (1) メチロトロフ酵母のメタノール応答性遺伝子のプロモーター領域；
- (ii) (a) 随意の分泌シグナル配列、および
- (b) 問題とする異種蛋白質
- から本質的になるポリペプチドをコードしているDNA配列；および
- (iii) メチロトロフ酵母中の機能的な転写ターミネーター；

ここで前記DNA配列は、前記ポリペプチドをコードしている配列の転写のために機能的に作用するようにお互いに関連している。本発明の実施に使用される発現ベクターに随意に含まれている分泌シグナル配列をコードしているDNA配列には、蛋白質分解感受性生成物に関連した天然の分泌シグナル配列をコードしてい

が通常有用である；しかしながら、効率を上げるには相同性の程度を最大にするのが好適である。

蛋白質分解感受性生成物の組換え発現の宿主の形質転換に本発明に従って使用されるDNA構成物は随意の一つまたはそれ以上の発現カセットに加えて選択可能マーカー遺伝子をさらに含んでいる。この目的には、メチロトロフ酵母中で機能的に作用する任意の選択可能マーカー遺伝子が用いられる、即ち、メチロトロフ酵母細胞に表現型を与え、それにより大多数の非形質転換細胞の中でも同定が可能になり、および選択的に増殖する。適した選択可能マーカー遺伝子には、例えば、独立栄養性突然変異体P. パストリス (pastoris) 宿主株および宿主欠陥を補足する野生型合成遺伝子から組立てられた選択可能マーカー系が挙げられる。例えば、HIS4⁺ P. パストリス (pastoris) 株の形質転換にS. セレビジエ (cerevisiae) またはP. パストリス (pastoris) HIS4 遺伝子が用いられるであろうし、ARG4⁺ 突然変異体 P. パストリス (pastoris) 株の形質転換にはS. セレビジエ (cerevisiae) ARG4 遺伝子またはP. パストリス (pastoris) ARG4 遺伝子が用いられるであろうし、URA3⁺ 突然変異体 P. パストリス (pastoris) 株の形質転換には、S. セレビジエ (cerevisiae) URA3 遺伝子またはP. パストリス (pastoris) URA3 遺伝子が用いられるであろう。

さらに、本発明のこの態様に従った蛋白質分解感受性生成物の組換え発現の宿主の形質転換に使用されるDNA構成物は、随意に細胞中で機能的に作用する選択可能マーカー遺伝子をさらに含んでいる。従って、大多数の非形質転換細胞の中から同定されおよび選択的に増殖するように細胞細胞を形質転換することを可能にする細胞表現型を与える任意の遺伝子が使用できる。この追加の選択可能マーカーは本発明のDNAの増殖のため大腸菌のような細菌内への形質転換を可能にする。適した選択可能マーカーにはアンピシリン耐性遺伝子 (Amp^r)、テトラサイクリン耐性遺伝子 (Tc^r) などが含まれる。

本発明のDNAが細菌細胞でも適用するように意図された場合、細菌の世代から世代へ本発明のDNAが維持されるのを確実にするため、DNA構成物中に細

るDNA、S. セレビジエ (cerevisiae) α-融合因子 (αMF) リーダー配列をコードしているDNA (プロセッシング部位をコードしているDNA配列を含む、lys-arg)、およびウシ リゾチームC シグナル配列のようなメチロトロフ酵母細胞で機能するシグナル配列を含んでいる。

本発明に従って使用されるメチロトロフ酵母で機能する転写ターミネーターは (a) 転写体中でポリアデニル化信号およびポリアデニル化部位を提供するサブセグメントおよび/または (b) 発現カセットで使用されるプロモーターからの転写の転写終結信号を提供するサブセグメントを持っている。ここで使用される術語“発現カセット”とは本明細書および請求の範囲を通して、発現過程に機能的に作用する配列を含むDNA配列を意味している。全転写ターミネーターは蛋白コード化遺伝子からとられ、それはプロモーター系の遺伝子と同じでも異なっているてもよい。

蛋白質分解感受性生成物の組換え発現のための宿主の形質転換に使用される本発明のDNA構成物中、発現カセットのセグメントはお互いに“機能するように関連して”いるであろう。蛋白質分解感受性生成物をコードしているDNA配列はプロモーター、分泌シグナル配列 (もし用いられるなら) および転写ターミネーターに関して機能的に作用するように位置し配向されている。従って、プロモーター領域の制御下、ポリペプチドをコードするセグメントは、翻訳により所望のポリペプチドを提供できる転写体内へ転写される。適切な読み枠の位置決定および発現カセットの種々のセグメントの配向は当業者には周知のことである；より詳細には説明は実施例に与えられている。

本発明の実施には、蛋白質分解感受性生成物の組換え発現のための宿主は、一つのDNA断片に含まれている上記発現カセットの多数のコピーで (好適には先端-末端で配向している) 形質転換されるのが好適である。

さらに、本発明に従ったDNA構成物が部位特異的組込みによる蛋白質分解感受性生成物の組換え発現の宿主の形質転換に使用された場合、構成物を含む発現カセットは直鎖状DNA断片 (その中のDNA断片の組込みに有効なように宿主の所望の座位へ配向する) である。もし、導入されるべきDNAが標的遺伝子の断片座位と0.2 kbほどの相同性しか持っていないなら、一工程遺伝子組込み

の複製起点を包含させる事が望ましい。細菌の複製起点の例としては*f1-or*i、コリシン、Col E1などが含まれる。

ここで使用される術語“発現ベクター”には、その中に含まれているDNA配列を発現できるベクターを含んでいるつもりであり、そのような配列はその発現が有効なように他の配列と (即ち、プロモーター配列) 機能的に作用するような関係にある。一般には、組換えDNA技術で通常使用される発現ベクターはしばしば“プラスミド”の形である (即ち、環状、二本鎖DNAループ、そのベクター形では染色体に結合しない)。本明細書においては術語“ベクター”および“プラスミド”は互換的に使用されている。しかしながら、本発明には機能的に均等な他の形の発現ベクターも同様に含まれるつもりである。

ピキア (Pichia) 属の酵母を形質転換する方法、ならびに、そのような酵母細胞の培養に応用できる方法は一般的には本分野では既知である。

本発明に従うと、上記の修飾遺伝子および/または異種の蛋白質分解感受性生成物をコードしている発現カセットを含む構成物は上記のように、スフェロプラスト技術または全細胞増殖リチウム酵母形質転換系によりピキア (Pichia) 細胞内へ移される。

所望の表現型および遺伝子型である形質転換された株はバッチまたは連続モードで発芽槽中で増殖される。メチロトロフ酵母中の組換えDNAに基づく生成物の大規模生産には、三段階、高細胞密度発芽系が現在好適な発芽プロトコールとして用いられている。最初の段階 (または増殖段階) では、発芽宿主は非誘導炭素源 (例えばグリセロール) を過剰に含む限定最小培地中で培養される。そのような炭素源での増殖では異種遺伝子発現は完全に抑制され、異種蛋白質を発現しない細胞の発生が可能である。この増殖段階の間、P. パストリス (pastoris) 細胞は一般にその最適増殖に約5.0 pHを好んでいるので、培地のpHを約5に維持することが現在のところ好適である。次に、さらに細胞増殖を増加させ、メタノール応答性プロモーターを抑制するため、短い期間、非誘導性炭素源制限増殖を行う。この制限増殖期間の培地のpHは適切なpH値に維持される (使用される実際のpHは発現に使用された特定の宿主株および発現される生成物に依存する)。

制限条件下での増殖期間に就いて、プロセスからの生成物の同時除去による連続式法；またはプロセスのメタノール含量が低レベルに維持されるバッチ方法（ここでは“メタノール過剰供給バッチモード”と称される）により発酵槽にメタノールが添加される。メタノールの添加はメタノール応答性プロモーターにより制御されている遺伝子の発現を誘導する。この第3段階は、この段階で大多数の組織換え生成物が発現されるので生産段階と称される。生産段階の間の増殖のpHは適切なpH値に維持される（用いられる実際のpHは発現に使用される特定の宿主株および発現される特定の生成物に依存する）。

術語“培養”とは細胞増殖の助けとなる増殖中での細胞の増殖、およびそのすべての離代培養を意味している。術語“離代培養”とは別の培養の増殖細胞（原培養）の細胞培養、または問題とする離代培養および原培養間で実施された離代培養工程の敢とは無関係に、原培養の任意の離代培養を意味している。

本発明の好適な実施態様に従うと、蛋白質分解感受性生成物の生産に使用される異種蛋白質発現系は、非常に効率が良い程度に制御されるP. バストリス (P. pastoris) のメタノール制御AOX1遺伝子から誘導されたプロモーターが利用される。この遺伝子は同様に転写ターミネーター領域でもありうる。現在好適な発現カセットは、お互いに機能的に作用するP. バストリス (P. pastoris) のAOX1プロモーター、随意的分泌シグナル配列をコードしているDNA、蛋白質分解感受性生成物（例えば成熟IGF-1、EGF、GRFなど）をコードしているDNA配列、およびP. バストリス (P. pastoris) のAOX1遺伝子から誘導された転写ターミネーターを含んでいる。好適には一つの隣接するDNA断片上の複数の発現カセットを得るため、一つのDNA断片上に、先導末端の配向で二つまたはそれ以上のそのような発現カセットが含まれている。

多発現カセットで形質転換されるべき好適な宿主細胞は現在のところ、形質転換DNA断片上に存在するマーカー遺伝子で補足できる少くとも一つの突然変異を持つP. バストリス (P. pastoris) 細胞である。好適にはHIS4⁻ (GS115) またはARG4⁻ (GS190) 単一独立栄養性突然変異体P. バストリス (P. pastoris) 株が用いられるが、HIS4⁻/URA3⁻ (GS4-2) またはHIS4⁻/ARG4⁻ (PPF1) 二重独立栄養性突然変異体P.

バストリス (P. pastoris) 株も用いられる。

一つまたはそれ以上の発現カセットを含む断片は宿主の代謝欠陥を補足するマーカー遺伝子および隨意に細菌マーカー遺伝子、ベクター組み込みを方向付ける酵母DNA配列などを含むプラスミド内へ挿入される。

本発明の特定の實施態様に従うと、オロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子を含むピキア (P. ichia) 属の種から得られる単離DNA断片が提供される。オロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子はしばしばURA3と称される。例えばそれはURA3⁻欠失株の補正に使用できる。ピキア (P. ichia) ゲノムの特定の座位を（即ち、URA3座位への）DNAの目標とさせる能力が本新規遺伝子の別の使用法である。この新規遺伝子は図12に示した制限地図を参照して特徴付けできる。もしくはこの新規遺伝子は配列番号4に示したものと同一アミノ酸配列を實質的に持つ蛋白質をコードしていると特徴付けできる。当業者は上記のアミノ酸配列は種々のヌクレオチド配列によりコードできることを認識しているであろうが、上記のアミノ酸配列をコードしている好適なヌクレオチド配列は配列番号3に示された配列と實質的に同一である。

本発明の別の特定の實施態様に従うと、組織換えDNA物質で形質転換できる宿主として（宿主はオロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子欠失している）ピキア (P. ichia) 属の酵母細胞が提供される。URA3が欠失した宿主株は、無菌の形のURA3遺伝子を含むDNAによる形質転換に使用でき、それにより所望の形質転換が起こったかどうかを容易に決定できる（形質転換が成功した細胞ではウラシル原栄養性が戻ることに）。URA3⁻ピキア (P. ichia) 株とピキア (P. ichia) オロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼマーカー遺伝子の組み合わせは、蛋白質分解活性を欠くピキア (P. ichia) の組織換え株の生産に使用するための特に有用な選択系を提供する。そのような選択系はここでは“二方向性選択法”と称される。蛋白質分解活性を欠くピキア (P. ichia) の発生のためのこの選択系は、欠失遺伝子を含むDNA断片が宿主生物のゲノムへ付加され、続いて内在性標的遺伝子配列および組み込まれたベクター配列間の相間的組織換えにより宿主からDNA断片の一部および内在性配列を除去する“ポップイン-ポップアウト”

遺伝子破壊技術を使用する。最初に、形質転換体はURA3のようなマーカー遺伝子を含む破壊ベクターの取り込みにより選択される（即ち、“ポップイン”工程）。次に、選択された形質転換体は内在性遺伝子配列および組み込まれたベクター配列間で組織換えが起こり、それによりマーカー遺伝子を含むベクターの一部および宿主の内在性配列が切り出された葉を同定するためにスクリーニングされなければならない（即ち、“ポップアウト”工程）。URA3遺伝子およびURA3⁻宿主に基づく二重選択系で所望の株の連続的同定が行われる。

この型の遺伝子破壊は典型的には、5-フルオロオロチン酸 (5-FOA) 耐性により同定できるUra⁻株で実施される。破壊されるべき標的遺伝子の欠失コピーおよび機能的URA3遺伝子を破壊ベクターは含んでいる。Ura⁻宿主細胞のゲノムへの破壊ベクターの組み込みは、一つの機能的標的遺伝子および一つの新機能的（即ち、破壊された）標的遺伝子を含むUra⁻形質転換体を生産させる。Ura⁻形質転換体はウラシル非存在下で増殖できるその能力により、容易に同定される。

組織換えにより、欠失遺伝子のみを残して機能的標的遺伝子が除去された株を単離するため、組織換えに伴うURA3遺伝子の損失（“ポップアウト”）により生じた5-FOA耐性の復元でUra⁻形質転換体がスクリーンされた。URA3遺伝子型の再生はゲノム中の他の遺伝子の使役での破壊のための“ポップイン-ポップアウト”過程の繰返しを可能にする。蛋白質分解活性を欠くピキア (P. ichia) 株の発生にこの選択系を使用するためには、ピキア (P. ichia) 蛋白質分解経路に含まれる蛋白質をコードする遺伝子の断片およびURA3遺伝子を含むDNA構成物でURA3⁻宿主が形質転換される。遺伝子付加による形質転換DNAの部位特異的組み込みにより（即ち、“ポップイン”）、蛋白質分解活性に直接または間接的に影響を及ぼす遺伝子の座位に一つの機能的および一つの新機能的な遺伝子ならびに無菌のURA3遺伝子を得る。URA3遺伝子を取り込んだ株は陽性選択により同定される（当業者にはよく知られている技術を用いて、例えばウラシルを欠く最小増殖上で株を増殖させ、そのような増殖上で増殖できる株を選択することにより）。蛋白質分解活性に影響する蛋白質をコードしている遺伝子の座位での機能的、非機能的およびURA3遺伝子の

コンフィギュレーションにより、機能的および非機能的遺伝子の一つおよびURA3遺伝子の喪失を生じる機能的および非機能的遺伝子間の組織換えが可能になる（即ち“ポップアウト”）。

その後、細胞をウラシル経路中間体の非毒性類似体である5-フルオロオロチン酸 (5-FOA) (URA3⁻ 株により代謝された場合、細胞にとって毒性のある化合物を産生する) を含む増殖地上に播種することにより、機能的URA3遺伝子を欠く株が陽性選択できる。なぜならURA3⁻株はウラシル経路の特定の点が阻害されているので5-FOAを代謝せず、その毒性効果を受けない（従って“5-FOA耐性”と称することができる）。対照的にURA3⁻株は5-FOAを代謝して毒性化合物を産生し、それがURA3⁻細胞の増殖を妨げる。得られるURA3⁻細胞は機能的標的遺伝子も欠いており、蛋白質分解活性が欠失されている。URA3⁻表現型は復元されるので、得られる細胞は選択可能マーカーとしてURA3を再び用いて形質転換できる。

ウラシル経路中間体の毒性類似体を用いて、機能的URA3遺伝子を欠く株を陽性選択できるため、これをピキア (P. ichia) 宿主に複数の表現型変化を与える非常に都合の良い“ポップアウト”法として使用できる。

同じ種の野生型株中に存在する蛋白質分解活性と比較して蛋白質分解活性が欠失されているURA3⁻ピキア (P. ichia) 株は天然形のURA3遺伝子および蛋白質分解感受性生成物を含む発現ベクター（両方とも同一のベクターの一部として、または宿主内へ形質転換される第二のベクターとして）での形質転換に特に有用である。ウラシル原栄養性が復元されたこれらの形質転換体は（簡単なスクリーニング法により容易に決定できる）、それらの中に蛋白質分解感受性生成物をコードしている遺伝子を取り込んでいるはずであり、従って生成物発現に直接利用できるであろう。

本発明はここで以下の実施例を参照しながらより詳細に説明されるが、以下の実施例に制限されるわけではない。

実施例

実施例1: P. バストリス (P. pastoris) PEP4遺伝子の単離

P. バストリス (P. pastoris) PEP4遺伝子は、相間的なサッカロマ

イセス セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) PEP4遺伝子の放射性標識断片とハイブリダイズするその能力を利用してバクテリオファージ ラムダからのEMBL3 P. パストリス (*pastoris*) ゲノムDNAライブラリーから同定された。ハイブリダイズした組換えファージDNAを含む陽性ブランクを単離することによりP. パストリス (*pastoris*) PEP4遺伝子がクローン化された。

A. P. パストリス (*pastoris*) EMBL3ゲノムDNAライブラリーの作製

バクテリオファージ λ がP. パストリス (*pastoris*) PEP4遺伝子のクローニングのための運搬体として使用された。P. パストリス (*pastoris*) ゲノムDNAのSau3A部分消化の断片が細胞宿主中の組換えDNAの増殖に必須のバクテリオファージ λ ゲノムの要素を含んでいるバクテリオファージ λ ベクター-EMBL3 [Frischauf, A. -M. et al. (1983), J. Mol. Biol. 170:827] 内へ挿入された。P. パストリス (*pastoris*) DNA含有EMBL3ベクターはインビトロで感染性ビリオンへパッケージされバクテリオファージ λ P. パストリス (*pastoris*) ゲノムDNAライブラリーを得た。ライブラリーの増殖は組換えウイルスで感染させた大腸菌宿主細胞中の組換えDNAの増殖により達成された。ガラス薄液を放射 [Cregg et al. Mol. Cell. Biol. 5:3376-3385 (1985)] を用いて単離されたピキア パストリス (*Pichia pastoris*) ゲノムDNA (NRRL Y-11430株, Northern Regional Research Center, Peoria, IL) は0.1 μ g/ μ gの有効濃度で、37℃にて7.14.21および28分のインキュベーションによるSau3Aの消化を実施した。各々のインキュベーション混合物の一部は消化されたDNA断片の大きさを決定するため1%アガロースゲル上、電気泳動により分離された。7および14分インキュベーションされた消化物は主として9-23 kb断片から成っていると思われる。これらの消化物をプールし、下記のように調製されたEMBL3ベクター アームへ連結した。

リーニング

PEP4遺伝子に対するピキア (*Pichia*) ゲノムを充分にスクリーンするため、50,000の組換えファージおよび大腸菌感受性宿主株LE392 (Stratagene EMBL3クローニングキットで提供される) を4つの大きな150mmプレートに播種した。8-7時間増殖させた後、プレートを4℃に冷やした。各々のプレートをマークし、各々のプレートのブラークリフトの複製は各々のプレート上にニトロセルロースを置くことにより調製した。フィルターを酸性させ、中和し、続いて、S. セレビジエ (*cerevisiae*) PEP4遺伝子 [Thomas Stevens, University of Oregon, Eugene, Oregonの研究室から入手したS. セレビジエ (*cerevisiae*) PEP4遺伝子を含む、ゲルで精製されたS. セレビジエ (*cerevisiae*) DNAの³²P標識4.0 kb断片: Rothman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3248-3252 (1986) 参照] で検査された。ハイブリダイゼーションは30%ホルムアルデヒド、6×SSC、5×デンハート溶液、20mM トリス・HCl: pH8.0, 1mM EDTA, 0.1% SDSおよび100 μ g/mlサケ精子DNAを含む溶液中、37℃で実施された。ハイブリダイゼーション後、2×SSCおよび0.1% SDSを用い室温で3回フィルターを洗浄した。これらの最初の洗浄に続いて、2×SSCおよび0.1% SDSを用いて55℃にて2回洗浄した。

S. セレビジエ (*cerevisiae*) PEP4遺伝子の断片にハイブリダイズするDNAを含む15の陽性ブランクがフィルターのオートラジオグラムから二通り (in duplicate) 同定された。15の陽性ブランクの各々の周りの領域を単離し、SM緩衝液中に置いた。単離物のうちの6つを10⁻⁷および10⁻⁸の希釈で大腸菌株LE392と共に小さな100mmプレートに播種した。第1のブラークスクリーニングで使用されたものと同一のハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下、各々のプレートのシングル ブラークリフトがS. セレビジエ (*cerevisiae*) PEP4遺伝子断片で検査された。この2回目のスクリーニングにおいてオートラジオグラム上12の陽性ブランク

EMBL3ベクター アームはベクター (EMBL3クローニングキット, Stratagene, Cloning Systems, San Diego, CA) から得られた: カタログ番号241211) のBamHIおよびEcoRIによる二重消化により調製された。スタファー断片からアームを分離している小さなBamHI/EcoRIリンカーはエタノールによる選択的沈殿により消化物から除去された。1 μ gのEMBL3前消化アームへのSau3A消化ピキア (*Pichia*) ゲノムDNA (0.5 μ g) の結合は5 μ iの反応混合物の4℃、2日間のインキュベーションにより達成された。

P. パストリス (*pastoris*) ゲノムDNA断片およびEMBL3ベクター アームの結合により調製された組換えバクテリオファージDNAはインビトロで市販のパッケージング抽出物 (Stratagene EMBL3クローニングキット) を用いてパッケージングされた。EMBL3に基づくP. パストリス (*pastoris*) ゲノムライブラリーは組換えファージをプロファージP2を含む大腸菌感受性宿主株P2 392 (Stratagene EMBL3クローニングキットで提供されている) とともに播種することにより増殖された。野生型バクテリオファージは大腸菌株P2 392中では増殖しない。P2感受性を与える野生型遺伝子の二つを欠く組換えEMBL-3によるバクテリオファージはこのP2含有大腸菌株中でよく増殖できる。増殖において、宿主株として大腸菌P2 392を使用すれば、細胞宿主中組換えファージのみが増殖することが保証される。

EMBL3に基づくP. パストリス (*pastoris*) ゲノムDNAのすべてのプレートにSM緩衝液 (5.8g NaCl, 2g MgSO₄·H₂O, 50ml 1Mトリス・HCl, pH7.5, および5ml 2%ゼラチンを1リットルを含む) を層積した。5時間後、上澄み液を集めてプールし、説明書に従って力価およびゲノム当量を計算した。このライブラリーは約10⁷ゲノム当量を含んでおり、その力価は6×10¹¹ブランク形成単位/ml (pfu/ml) であった。

B. プローブとしてS. セレビジエ (*cerevisiae*) PEP4遺伝子を用いるEMBL3 P. パストリス (*pastoris*) ゲノムDNAのスク

が検出された。これらのシングルブランクの9つが単離され、SM緩衝液中に置かれた。これらの9つのブランクの各々が10⁻⁷および10⁻⁸の希釈で大腸菌株LE392と共に小さな100mmプレートに播種された。再び、最初の2回のスクリーニングで使用したものと同一のハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下、S. セレビジエ (*cerevisiae*) PEP4遺伝子断片で各々のプレートのシングル ブラークリフトが検査された。各々のプレートはプレートに均等に分布する約10-20のブランクを含んでいた。フィルターのオートラジオグラムにより各々のプレート上のすべてのブランクがPEP4プローブにハイブリダイズしたことが明らかにされた。

異なるプレートから5つの別々のブランクを単離し、SM緩衝液中に置いた。これらの単離物の3つ (各々4721, 5111および5131と称される) の大規模培養からDNAが、組換えファージに含まれているPEP4遺伝子の同定、特異付けおよびサブクローニングのためにバクテリオファージ単離の調製法 [Maniatis, T., Fritsch, E. F. および Sambrook, J. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA (1982)] を用いて調製された。

C. S. セレビジエ (*cerevisiae*) PEP4遺伝子にハイブリダイズしたEMBL3 P. パストリス (*pastoris*) ゲノムDNAライブラリーの単離物中の挿入物の特異付け

EMBL3ピキア (*Pichia*) ゲノムDNAライブラリーからの3つの単離物 (4721, 5111および5131, 上記参照) から調製された組換えファージDNAは種々の制限エンドヌクレアーゼで消化され、0.8%アガロースゲル上で分離され、エチジウムブロミド染色により可視化された。さらに、これらの消化物の1 μ lが第2のアガロースゲル上で分離され、ニトロセルロース上にプロットされ放射性標識S. セレビジエ (*cerevisiae*) PEP4遺伝子の断片で検査された。30%ホルムアルデヒド、6×SSC, 5×デンハート溶液、20mMトリス・HCl, pH8.0, 1mM EDTA, 0.1% SDS

Sおよび100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ サケ精子DNAを含む溶液中で、37℃でハイブリダイゼーションが実施された。続いてフィルターは2×SSCおよび0.1%SDSを用いて室温で5分間3回、続いて2×SSCおよび0.1%SDSを用い55℃で5分間2回洗浄した。

2つのクローン(5111および5131)からのDNAの同じ消化物がエチジウムブロミド染色により決定され、同じパターンの制限酵素断片が得られたが、第3のクローン(4721)からのDNAの同じ消化物からは異なった断片パターンが得られた。S. セレビジエ(*Cerevisiae*) PEP4遺伝子断片に対するサザンブロットハイブリダイゼーションにより各々のクローンからのDNAの制限酵素断片の分析により、クローンの2つの組の両方とも同じ大きさの一本のハイブリダイズする断片を含んでいることが明らかにされクローンの二つの組はプローブハイブリダイズした共通の重なるDNA配列を持っていることが示された。

D. クローン化P. パストリス(*Pastoris*) PEP4遺伝子のサブクローニングおよび特徴づけ

プローブとして相関的なS. セレビジエ(*Cerevisiae*) PEP4遺伝子を用いるEcoRI消化P. パストリス(*Pastoris*) ゲノムDNAのサザンブロットハイブリダイゼーションにより決定されたごとく、P. パストリス(*Pastoris*) PEP4遺伝子はP. パストリス(*Pastoris*) ゲノムの10.6 kb EcoRI断片内に含まれている。実施例1Cに記載したごとくクローン4721のEcoRI消化DNAのサザンブロットハイブリダイゼーションは、それがS. セレビジエ(*Cerevisiae*) PEP4遺伝子へハイブリダイズした10.6 kb断片を含んでいることを明らかにした。クローン化P. パストリス(*Pastoris*) PEP4遺伝子の操作を容易にするために、単離4721からのDNAのEcoRI断片上に含まれるP. パストリス(*Pastoris*) ゲノムDNAがpUC19内へサブクローニングされた。クローン4721(25 μg)が300 μl の緩衝液中、EcoRI(60単位)にて消化された。消化DNAは0.65%アガロースゲル上で分離され、DE81ペーパーで10.6 kb EcoRI断片が単離された。精製断

片は400 μl の1M NaClでペーパーから洗い出され、フェノール/クロロホルムで抽出された。DNAは次にエタノールで沈殿され、10 μl の緩衝液中に水に再懸濁された。約50 ngの10.6 kb断片はEcoRIで切断され、脱リン酸化されている等量のpUC19に連結された。連結混合物は大腸菌株MC1061の形質転換に使用された。アンピシリン耐性コロニーが選択され、診断10.6 kb EcoRI断片の存在をコロニーDNAの制限酵素消化物の分析によりスクリーニングした。大腸菌プラスミド調製物は正しいプラスミド(pEP202と名付けられた)を含むコロニーから作製された。プラスミドpEP202は完全P. パストリス(*Pastoris*) PEP4遺伝子を含んでいる(図2参照)。

クローン化P. パストリス(*Pastoris*) PEP4遺伝子の配列分析を容易にするために、P. パストリス(*Pastoris*) PEP4遺伝子の一部がpUC19内へサブクローニングされた。プラスミドpEP202はBamHIおよびEcoRIで消化された。反応混合物は0.7%アガロースゲル上で分離され、DNAの0.45 kb BamHI断片(図2参照)がDE81ペーパーを用いて単離された。精製断片はBamHIによる消化により直鎖状化され、脱リン酸化されているpUC19(20 ng)と連結された。連結混合物は大腸菌株MC1061の形質転換に使用された。形質転換体はアンピシリン耐性で選択され、シングルBamHI断片の存在をコロニーDNAの制限酵素消化物の分析でスクリーニングした。この形質転換から生じるシングルコロニーは適切なDNA構成物を含んでいることが観察され、pEP205と名付けられた(図3参照)。

プラスミドpEP202の配列分析でS. セレビジエ(*Cerevisiae*)のPEP4遺伝子と70%の相関性を持つDNA配列と同定された。pEP202のこの配列によりコードされているアミノ酸配列はS. セレビジエ(*Cerevisiae*) PEP4遺伝子によりコードされている配列と69%相関的である。

実施例11: P. パストリス(*Pastoris*)のPEP4欠失(PEP4⁻)株の開発

A. P. パストリス(*Pastoris*) PEP4遺伝子破壊ベクターpDR

で消化され、消化されたDNAは0.7%アガロースゲル上で分離された。2.6 kb断片含有HIS4遺伝子は400 μl の1M NaClで抽出してDE81ペーパーから単離され、400 μl のフェノール/クロロホルムで抽出され、エタノールで沈殿されて10 μl の水に再懸濁された。この2.6 kb BglII断片のpEP301の特異的BglII部位への挿入に先立って、約20 μg のpEP301がBglIIで消化され、脱リン酸化されおよびフェノール/クロロホルムで抽出された。次に、約50 ngの2.6 kb HIS4含有断片を約50 ngのBglII消化pEP301と、1 μl の緩衝液、1 μl のリガーゼおよび水を含む総量で10 μl の溶液中で連結させることにより2.6 kb HIS4含有断片がpEP301内へ挿入された。結合は室温で3時間実施され、連結混合物はMC1061細胞の形質転換に使用された。アンピシリン耐性コロニーから調製されたプラスミドDNAはBglII, SalI, BglII/SalI, BglII/SalI, PvuI, NcoIおよびKpnIで消化され、pDR401の作製が確認された。制限断片パターンは正しいプラスミドpDR401に期待されるものと一致した(図5参照)。プラスミドpDR401はPEP4構造遺伝子内の特異的BglII部位にP. パストリス(*Pastoris*) HIS4遺伝子が挿入されたpUC19であり、したがってPEP4構造遺伝子を破壊している。

B. pDR401の断片によるHIS4 P. パストリス(*Pastoris*)株のGS115の形質転換

P. パストリス(*Pastoris*)のPEP4株を作り出すため、HIS4 PEP4 P. パストリス(*Pastoris*)株GS115(ATCC 20864)がスフェロプラスト法(米国特許第4,879,231号参照)に従ってpDR401の5.3 kb EcoRI/SacI断片20 μg で形質転換された。pDR401のこの断片はHIS4遺伝子含有PEP4欠失遺伝子と一致している。この型の組込みにより生じる形質転換体は原発性であり、それに基いて非形質転換細胞から区別できる。形質転換の頻度は約10³ μg^{-1} DNAであった。

C. 形質転換体の特徴付け

401の作製

P. パストリス(*Pastoris*)のPEP4欠失(PEP4⁻)株の開発に使用するためベクターpDR401が作製された。このベクターは、P. パストリス(*Pastoris*)のPEP4株の形質転換に使用された場合、野生型PEP4遺伝子の置換による宿主ゲノム内へ組込まれる、欠陥のあるP. パストリス(*Pastoris*) PEP4遺伝子を含んでいる。

pDR401は以下のごとく2工程法で作製された。第1の工程では、pEP202からpDR401作製における基礎ベクター(基礎ベクターpEP301)が作製された。ベクターpEP301はpUC19配列およびpEP202からのクローン化P. パストリス(*Pastoris*) PEP4遺伝子を含んでいる。プラスミドpEP202(15 μg)はSacIで消化された。5.5 kb SacI断片(SacIリンカーから時計回りに5時のSacI部位まで広がった断片、およびすべてのpUC19配列およびPEP4遺伝子を含んでいる; 図2参照)がDE81ペーパーを用いて0.7%アガロースゲルから単離された。断片は400 μl の1M NaClでペーパーから抽出され、400 μl のフェノール/クロロホルムで抽出され、エタノールで沈殿された。このDNAは1 μl のリガーゼおよび1 μl (10 ng)のDNAを含む100 μl の溶液中でそれ自身と連結された。連結混合物は室温で1時間インキュベートされた後、大腸菌株MC1061の形質転換に使用された。アンピシリン耐性コロニーが選択され、シングル5.5 kb BglII断片の存在をコロニーDNAの制限酵素消化物の分析によりスクリーニングした。プラスミドDNAは正しいプラスミド(pEP301と名付けられた、図4)を含むMC1061の形質転換コロニーから調製された。

pDR401の作製の第2工程においては、P. パストリス(*Pastoris*) HIS4遺伝子がPEP4含有プラスミドpEP301内へ挿入され、最終ベクターが得られる。P. パストリス(*Pastoris*) HIS4遺伝子はpYJ8ACIaから誘導される2.6 kb BglII断片[Cregg, J. et al., Mol. Cell. Biol. 5:3376-3385(1985)]から単離された。プラスミドpYJ8ACIa(15 μg)はBglII

1. 形質転換体カルボキシペプチダーゼY活性の分析

HIS⁺形質転換体は次にコロニーオーバーレイ比色スクリーニング法 [Jones, E. *Genetics* 85: 23-33 (1977) 参照] を用いてカルボキシペプチダーゼY活性が分析された。このアッセイでは、HIS⁺形質転換体細胞は庫プレートから離されプレート当り300コロニーの密度でYEPD (酵母抽出物, 1%ペプトン, 2%デキストロスおよび2%庫) プレート上で増殖された。細胞の透過性を上げるため、プレートに40%ジメチルホルムアミド (DMF) を含む0.6%アガロースゲルおよび1.2mg/mlの高質APNE (N-アセチルD-フェニルアラニンβ-ナフチルエステル) をかぶせた。細胞は透過性を上げられるため、細胞の液相含有物のいくつかは試薬APNEに近づくことができる。アガロース オーバーレイが固化した後、プレートを5mg/mlファースト ガーネット塩の溶液中に浸漬した。APNEはカルボキシペプチダーゼYのエステル分解活性により切断される。この反応の生成物はファースト ガーネット塩に結合してコロニー中赤色を発する。カルボキシペプチダーゼY活性を欠くコロニーは塩と結合せず、従ってこの活性を持つコロニーよりもより弱く染色される。PEP4⁺コロニーはガーネット塩に暴露後最初の10-15分の間に赤色/ピンク色中心が現われた。対照的に、PEP4⁻菌株が欠失しているコロニーはこの色の発色が遅く、赤色PEP4⁺コロニーと比較してピンク色と区別された。このアッセイの結果に基づいて低いカルボキシペプチダーゼY活性を持つことが明らかにされたコロニー (即ち、PEP4⁺コロニーの指標としての強い赤色を発色しなかったコロニー) が単離され、マスタープレートに移され、対照コロニーとともに継代培養され、オーバーレイアッセイを用いて再びスクリーニングされた。再び強い赤色を発色しなかった20のコロニーが、ベクターpDR401の断片の縮込みによりこれらの形質転換体のPEP4⁺菌株が破壊されているかどうかを決定するサザンブロットハイブリダイゼーションによる分析のために選択された。

2. サザンブロットハイブリダイゼーション分析

低カルボキシペプチダーゼ活性を示した20の形質転換体株 (p1-p20と称される) からゲノムDNAが抽出され、SacIおよびEcoRIで消化され

た。この過程はHIS4含有PEP4欠失遺伝子を株の形質転換に使用された5.3kb EcoRI/SacI断片として遊離させるはずである。これらの消化DNAから2つのサザンブロットフィルターが調製された; 1つのブロットはクロニ化P. パストリス (*pastoris*) PEP4遺伝子の一部を含むpEP301 (図4参照) からの放射性標識1.4kb XbaI/EcoRV断片で探査され、他のブロットはHIS4遺伝子を含むpDR401からの放射性標識2.6kb BglII断片で探査された。比較の目的でSacIおよびEcoRIで消化されている形質転換体株GS115からの対照DNAも分析された。

SacIおよびEcoRIによるGS115からのゲノムDNAの消化によりpEP301の放射性標識XbaI/EcoRV断片中に含まれているPEP4遺伝子の一部にハイブリダイズする2.9kb断片が得られた。対照的にこのブロットは分析された20の形質転換体のうちの19からのSacI/EcoRI消化DNA中の異なる大きさの断片にハイブリダイズした。株p17からのDNAのみが親株からのDNAハイブリダイゼーションパターンと同一のパターンを与えた。残りの19株は非破壊PEP4遺伝子に特徴的な2.9kbハイブリダイズ断片を欠き、PEP4遺伝子ブロットへハイブリダイズする約5.3kb断片および/またはより大きな断片を含んでいた。5.3kb断片はSacI/EcoRIによる消化によりベクターpDR401から放出される形質転換DNAと同じ大きさであった。

株p1-p16およびp18-p20からのDNAのサザンブロットハイブリダイゼーションの結果は、これらの株は無害のHIS4遺伝子とともに欠損PEP4遺伝子を含んでおり株のPEP4遺伝子は破壊されていることを示している。P. パストリス (*pastoris*) のPEP4株のより大規模な培養物のプロスの蛋白質分解活性を分析するため、実験例11に記載されているように株p13が1リットル発酵で増殖された。

3. 形質転換体プロテイナーゼA活性の分析

a. プロトコール

8つの形質転換株のプロテイナーゼA活性がJones et al. の方法

[*Genetics* 102: 655 (1982)] に基づく酵素アッセイを用いて評価された。いくつかの対照株もまたこのアッセイで評価された: PEP4およびS. セレビジエ (*cerevisiae*) のPEP4株 (株DBY747および20B12、各々Yeast Genetic Stock Center, University of California, Berkeley, CAから) およびP. パストリス (*pastoris*) のPEP4野生型株 (株NRRL Y-11430, Northern Regional Reasearch Center, Peoria, IL)。

プロテイナーゼAはアスパルテイル プロテアーゼ活性に関与する液相性酵素であり、S. セレビジエ (*cerevisiae*) のPEP4遺伝子によりコードされている。形質転換体細胞抽出物のプロテイナーゼ活性の評価に使用される方法は酸性ヘモグロビンからのプロテイナーゼ媒介アミノ酸放出の測定に基づいている。形質転換体細胞抽出物は酸性ヘモグロビンとインキュベートされ、抽出物中に存在するプロテイナーゼA活性はゼロ時間と90分のインキュベーション後に放出されるアミノ酸の量の相違を測定することにより決定された。

S. セレビジエ (*cerevisiae*) 対照株DBY747 (PEP4) および20B12 (PEP4⁺)、PEP4 P. パストリス (*pastoris*) 株NRRL Y-11430およびP. パストリス (*pastoris*) の実験PEP4株の培養物をYEPD培地中定常期まで増殖させた。培養細胞 (20 OD₆₀₀単位) を10mMアジ化ナトリウム中で洗い、次に400μlの100mMトリス, pH7.5中細胞と洗浄ガラスビーズを1分間ボルテックスすることにより溶菌させた。溶菌細胞はエーペンドルフチューブ中で10分間遠心分離して細胞破片を除去した。遠心後に得られた上澄液 (粗抽出物) は以下のごとくプロテイナーゼA活性が試験された。酸性性1%ヘモグロビン (400μl) を50μlの粗抽出物に加え、37℃で90分間インキュベートした。0.2mMの1N過塩素酸の添加により反応を停止させた。遠心分離により不溶性物質を除去し、200μlの0.31M NaClを200μlの上澄液に加えた。この溶液の40μlに対し、遊離アミノ酸のためのPierce BCA蛋白質アッセイキット (例えば米国特許第4,839,295号参照) を用いてアッセイ

を行った。90分間インキュベーションを行った試料中に存在する遊離アミノ酸の量がブランク (ゼロ時間で停止された反応混合物の試料から成る) 中に存在する量と比較された。これら2つの試料間の遊離アミノ酸の相対的相違がプロテイナーゼA活性の尺度である。

b. 結果

対照および形質転換株のプロテイナーゼAアッセイの結果 (表1参照: ΔODが試料中の遊離アミノ酸の濃度の尺度である) はS. セレビジエ (*cerevisiae*) のPEP4⁺株のプロテイナーゼA活性はS. セレビジエ (*cerevisiae*) のPEP4⁺株のそれの約10%であることを示している。同様に、PEP4形質転換株 (株p1, p2, p5, p8, p13, p16およびp20) のプロテイナーゼA活性もS. セレビジエ (*cerevisiae*) のPEP4⁺株のそれの約10%のみである。P. パストリス (*pastoris*) のPEP4野生型株はS. セレビジエ (*cerevisiae*) のPEP4⁺株の約半分のプロテイナーゼA活性を示した。

表 1
プロテイナーゼAアッセイ結果

株	表型	ΔOD/μg蛋白質
D3Y747(S. cerevisiae)	PEP4 ⁺	28.1
20812(S. cerevisiae)	PEP4 ⁺	2.7
P. pastoris(protaris)対照 (NRRL Y-11430)	PEP4 ⁺	13.1
p13	PEP4 ⁺	3.3
p20	PEP4 ⁺	4.2
p17	PEP4(+?)	7.5
p18	PEP4 ⁺	0
p16	PEP4 ⁺	0
p13	PEP4 ⁺	3.3
p8	PEP4 ⁺	3.3
p5	PEP4 ⁺	5.0
p2	PEP4 ⁺	6.6
p1	PEP4 ⁺	6.0

欠失PEP4遺伝子によるPEP4株の形質転換により発生させたPEP4
P. pastoris (pastoris) 株のプロテイナーゼAアッセイで得られた
データは、形質転換により破壊された形質転換体のPEP4遺伝子を示したこれらの
形質転換体からのDNAのサザンブロット分析の結果と一致した。

実施例III: P. pastoris (pastoris) のPEP4株の発酵

A. 方法

ベクターpDR401のPEP4遺伝子含有SacI/EcoRI断片で株G
S115を形質転換することにより発生させたP. pastoris (pastoris)
株のPEP4株、p13はグリセロールバッチ増殖相、制限グリセロール供給
バッチ相およびメタノール供給バッチ相からなる相プロトコルに従って以
下のごとく1リットル発酵により増殖された。

はPorapakQカラム (Alltech) を用いるガスクロマトグラフィー
により決定された。

さらに、培養物の湿潤重量が発酵中の細胞増殖の指標として決定された。こ
の目的のためには、発酵培養物の1mlをマイクロフュージで4分間遠心分離し、
上澄液を傾斜させて捨て、湿潤ペレットを秤量した。

C. 結果

1リットル発酵中のP. pastoris (pastoris) p13のPEP4株
の増殖は発酵の開始から発酵培養物の湿潤細胞重量 (g/l) を決定する
ことによりモニターされた。発酵のメタノール供給バッチ相の間のp13株の増
殖の時間変化は、類似の1リットル発酵の間のHIS4 PEP4株G+PA0
804H2 (野生型HIS4遺伝子を含む発酵ベクターでHIS4 PEP4
P. pastoris (pastoris) 株GS115を形質転換することにより発
生する) の増殖の時間変化と比較した場合、P. pastoris (pastoris)
のPEP4株の増殖能力はPEP4株のそれと匹敵することが示された。

実施例IV: 1リットル発酵で増殖されたP. pastoris (pastoris) の
PEP4株のプロスの蛋白質分解活性の分析

P. pastoris (pastoris) PEP4遺伝子の破壊がP. pastoris
(pastoris) のプロス蛋白質分解活性の低下を伴ったかどうかを決定す
るため、PEP4株、株p13、およびPEP4株の1リットル発酵からのプロ
スの蛋白質分解活性が比較された。この研究においては、2つの異なるペプチ
ド、表皮増殖因子 (EGF; 米国特許出願番号323, 964号に記載されてい
るごとく、製品53アミノ酸EGF分子の最初の52アミノ酸から成る組換えで
合成された分子) および成長ホルモン放出因子 (GRF; EP206783に記載
されているごとく組換えで合成された) が別々にPEP4 P. pastoris
(pastoris) 株p13の1リットル発酵からの細胞を含まないプロス中で、
およびHIS4 PEP4 P. pastoris (pastoris) 株G+PA08
04H2の同様な1リットル発酵からの細胞を含まないプロス中で室温にてイン
キュベートされた。特定の期間のインキュベーションの後、各々のインキュベ
ーション混合物の一部が逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により試

1000mlの最小塩培地 (21ml 85%リン酸, 0.9g硫酸カルシウ
ム・2H₂O, 14.3g硫酸カリウム, 11.7g硫酸マグネシウムおよび3.
2g水酸化カリウム) および2%グリセロールを含む2リットルの発酵槽をオー
トクレーブした。殺菌液、4mlのPTM₁微量塩溶液 [8g/l硫酸銅・5H₂O,
0.08g/lヨウ化ナトリウム, 3g/l硫酸マンガン・H₂O, 0.2g
/lモリブデン酸ナトリウム・2H₂O, 0.02g/lホウ酸, 0.5g/l
塩化コバルト, 20g/l塩化亜鉛, 65g/l硫酸第一鉄・H₂O, 0.2g
/lビオチンおよび5ml硫酸) を発酵槽に添加し、濃NH₄OHでpHを5に
調整した。培地のpHは0.1%ストルクトールJ673泡消剤を含む50%N
H₄OHを添加することにより5に維持された。接種物は緩衝液母液 (YNB)
(YNB) グリセロール プレート (リン酸緩衝液YNB, 2%グリセロール,
2%凍干) から調製され、2%グリセロールを含むリン酸緩衝液YNB (11.
5g/L, KH₂PO₄, 2.66g/L K₂HPO₄, 0.67%酵母浸出液
塩, pH5) 中30℃にて一夜増殖させた。1-8のOD₆₀₀まで増殖されてい
る培養細胞の10-50mlを発酵槽に接種し、バッチ増殖をグリセロールが枯
竭するまで約1日の間続ける。グリセロール枯渇した時点で (溶存酸素の増加に
より示される)、10ml/hでのグリセロールの供給 (50%グリセロールに
12ml/LのPTM₁を加えたもの) を開始し、40mlのグリセロールが添
加されるまで続けられた。グリセロール供給の終了後、メタノールの供給 (10
0%メタノールに12ml/LのPTM₁を加えたもの) を約2ml/hの初期
速度で開始した。3時間後メタノール供給速度を6ml/hに増加させた。メ
タノール供給速度は12-18時間6ml/hに維持し、次に10ml/hに増加
し、発酵を維持する間10ml/hに維持された。400mlのメタノールが発
酵槽に添加された後、容器を取り出した。

B. 試料調製

発酵培養の試料 (15mlづつ) は発酵工程を通して種々の時間間隔で発酵槽
から取り出した。各々の試料は6500xgで5分間遠心分離してプロスおよび
細胞を分離した。これらの時点でのNH₄OH、泡消剤・グリセロールおよびメ
タノール濃度のレベルが記録された。上澄中のメタノールおよびエタノール濃度

されて (下に記載) 各々の試料中に残存する無傷のペプチドの量が決定され、そ
れによりペプチドの蛋白質分解の程度が決定された。

A. 逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

緩衝液およびP. pastoris (pastoris) 株の発酵からのプロス中の
EGFおよびGRFペプチドの分析に使用された逆相HPLC系は、Waters
600 (Bedford, MA) 溶媒送液システム、Watersモデル48
1 Lambda Max可変波長検出器、Wisp710Bオートインジェクタ
およびShimadzu Chrom-Pac検分器 (Cole Scientific, Moorepark, CA) である。PEP4 P. pastoris
(pastoris) 株p13およびHIS4 PEP4 P. pastoris (p
astoris) 株G+PA0804H2の発酵によるプロス試料は0.1Mリ
ン酸ナトリウム, pH5.0で1:10に希釈した。15マイクロリットルの濃
縮GRF貯蔵液が285μlの希釈プロスに添加され4時間インキュベートされ
た。リン酸緩衝液で同様に希釈したGRF貯蔵液もまた対照として4時間インキ
ュベートされた。60マイクロリットルのEGF貯蔵液は240μlの希釈プロス
または緩衝液に添加され、8時間インキュベートされた。各々のインキュベ
ーション混合物試料は別々に、Waters μBondapak C18逆相カラム
にインジェクトされた。20-60%移動相B (95%アセトニトリル, 5%水,
0.1%トリフルオロ酢酸) の20分での線形濃度勾配によりペプチドがカラム
から検出された。移動相A (0.1%トリフルオロ酢酸) は検出濃度勾配を制御
する移動相Bの希釈に使用された。

B. 結果

0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液, pH5.0, 中に含まれている無傷のEG
FまたはGRFおよびプロス中に含まれているEGFまたはGRFのHPLC分
析で得られたクロマトグラムを比較することにより無傷のペプチド [PEP4
P. pastoris (pastoris) 株の発酵プロス中およびP. pastoris
(pastoris) 株G+PA0804H2のプロス中でインキュベートされ
たEGFまたはGRF分子の] の量が評価された。標準の無傷のペプチドのHP
LC分析によるクロマトグラムは試料中に存在する標準ペプチドの量およびペ

チドの特有の保持時間を反映した主ピークから成っている。対照的に両方のペプチドの蛋白質分解断片は無傷のペプチドに関連した保持時間と異なった種々の長さの時間HPLCカラム上に保持される。従って、両方のペプチド(EGFまたはGRF)の蛋白質分解断片のHPLC分析からのクロマトグラムはピークの数および大きさおよび断片化程度に付随する保持時間などが無傷のペプチドのHPLC分析で得られるクロマトグラムと異なっている。これらの相違に基づいて、プロテインキナーゼ試料中の無傷のEGFまたはGRFペプチドの量を算定することが可能であった。

PEP4 *P. pastoris* (*pastoris*) 対照ブロス中でインキュベートされたGRFおよびEGF試料のHPLC分析に基づくと、PEP4株G+P AO804H2の発酵からのブロス中でインキュベーションした後、10%未満の各々の2つのペプチドが無傷で残っていることが決定された。対照的に、**PEP4** *P. pastoris* (*pastoris*) 株のブロス中のこれらのペプチドの蛋白質分解のレベルはPEP4株のブロス中よりも著しく低い(4時間のインキュベーション後でも>60%のGRFが無傷で残存; 8時間のインキュベーション後でも>90%が無傷で残存)。これらのデータは*P. pastoris* (*pastoris*) のPEP4遺伝子の破壊は株のブロス中の蛋白質分解活性をかなり減少させることを示している。

実施例V: *P. pastoris* (*pastoris*) URA3遺伝子の単離

P. pastoris (*pastoris*) URA3遺伝子は、大腸菌株CSH-28中のpyrF突然変異(オロチジン-リン酸カルボキシラーゼ活性の欠失に対応する)を補足するその能力でプラスミド(YEp13)に基づく**ピキア** (*P. ichia*) ゲノムライブラリー中で同定される。*P. pastoris* (*pastoris*) URA3遺伝子はライブラリーDNAで形質転換され、ウラシルを欠く培地上で増殖できる大腸菌株CSH-28のコロニーを単離することによりクローン化された。

A. *P. pastoris* (*P. pastoris*) YEp13ゲノムDNAライブラリー

プラスミドYEp13 [Broach等, *Gene* 8: 121-133 (19

79)] は、*S. cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (2μレプリコン) と*E. coli* (大腸菌) (pBR ori) の両方の複製の起源を含む便利なシャトルベクターである。さらに、YEp13は大腸菌の形質転換の選択的マーカーとして用いるためのAmp^r (アンピシリン耐性) 遺伝子と、*S. cerevisiae* における選択的マーカーとして用いるためのLEU遺伝子(ロシニン生成経路遺伝子) とを含む。*P. pastoris* (菌株NRRL Y-11430) ゲノムDNAライブラリーは、Cregg等が述べているように [Mol., Cell., Biol., 5: 3376-3385 (1985)]、プラスミドYEp13を用いて作製されている。

B. URA3遺伝子に関する*P. pastoris* YEp13ゲノムDNAライブラリーのスクリーニング

*pyrF*大腸菌株CSH-28 [Miller, J. H., *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州, コールドスプリングハーバー (1972) を参照のこと] はオロチジン-5'-ホスフェートデカルボキシラーゼ活性を有せず、合成培地上で増殖する場合にウラシルを必要とする。*S. cerevisiae* URA3遺伝子が大腸菌におけるpyrF突然変異を相補できることは実証されている [Rose, M., Grisafi, P. 及びBotstein, D., *Gene* 29: 113-124 (1984)]。それ故、大腸菌株CSH-28のpyrF突然変異を相補できる*P. pastoris* URA3遺伝子に関して*P. pastoris* YEp13ゲノムDNAライブラリーをスクリーニングするために、このライブラリーからのDNAによって、大腸菌株CSH-28を形質転換した。

形質転換CSH-28細胞をウラシルを含まない半合成培地上に置いた。非形質転換細胞はこの培地上で増殖しなかった。ウラシルを含まない平板培地 (plate) 上で増殖できるCSH-28形質転換細胞 (*P. pastoris* ゲノムライブラリーDNAによって形質転換) は10/形質転換用DNA μgの頻度で発生した。増殖のためにウラシルを必要としない形質転換細胞10個からプラスミドDNAを単離した。これらのプラスミドを大腸菌株CSH-28の形質転換

に用いた、10個のプラスミドの中の10個がこの菌株のウラシル要求性を高頻度で相補した。*P. pastoris* YEp13ゲノムライブラリーDNAによるCSH-28の形質転換によって発生した選択形質転換細胞の一つは6.6 kb SphIフラグメントを含む9.0 kbインサートを収容する。6.6 kb SphIフラグメントをさらに分析するためにpUC19のSphI部位にサブクローン化した。

この形質転換細胞からのプラスミドDNAをSphIによって消化させ、0.6%アガロースゲル上の電気泳動に供した。DE81ペーパーを用いて6.6 kbフラグメントを単離し、このペーパーから1M NaCl 400 μlによって抽出した。DNAはフェノール/クロロホルム 400 μlによって抽出し、エタノールによって沈殿させた。次に、6.6 kbフラグメントをアルカリホスファターゼ処理SphI消化pUC19と結合させた。この結合混合物を用いて大腸菌MC1061細胞を形質転換させた。アンピシリン耐性形質転換細胞を制限酵素消化コロニーDNAの分析によって6.6 kb SphIフラグメントの存在に関してスクリーニングした。この正確なプラスミドはpPU201と名付けた。プラスミドpPU201を用いてCSH-28を形質転換させた、このプラスミドはこの菌株のウラシル要求性を相補することができた。

C. プラスミドpPU201におけるインサートの特性化

pPU201を様々な酵素によって消化させ、生ずるフラグメントをDNA長さコンピュートプログラム (MapSort; ウィスコンシン大学 Genet. ics, ウィスコンシン州, マジソン) を用いて分析して、フラグメントの大体のサイズを判定することによって、プラスミドpPU201中の*P. pastoris* DNAの6.6 kbインサートの制限酵素認識部位の地図 (図6) を作成した。pPU201の6.6 kbインサート中に含まれるURA3遺伝子を正確に推定するために、pPU201の各制限酵素消化物の5 ngアリオートを1%アガロースゲル上での電気泳動によって分離させ、ニトロセロースに移し、*C. tr. opicalis* (*C. tr. opicalis*) URA3A遺伝子の放射能標識1.3 kb BglI Iフラグメントによって調べた (PCT公報第WO90/09449号を参照のこと)。25%ホルムアミド、6xSSC、5xDenhardt液

液、20mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM EDTA, 0.1% SDS) 及び100 μg/mlサケ精子DNAを含む溶液を用いて、フィルターをこのプローブに27°Cにおいてハイブリッド形成した。ハイブリッド形成後に、フィルターを1xSSCと1% SDSを用いて、室温において、1回洗浄につき5~10分間かけて、3回洗浄し、次に0.5xSSCと0.5% SDSを用いて、45°Cにおいて、1回洗浄につき10分間かけて、2回洗浄した。これらの緩和な条件は互いに異なるURA3遺伝子配列の間のハイブリッド形成を可能にした。pPU201の各消化物の追加のサンプルを同じ1%アガロースゲル上で分離し、ハイブリッド形成フラグメントと非ハイブリッド形成フラグメントとを比較するために臭化エチジウムによって染色した。ハイブリッド形成フラグメントとpPU201の制限マップとの比較は、pPU201中のURA3遺伝子を図6に示す約1.3 kb *NcoI-SalI* フラグメントに局在化することを可能にした。これを知ることによって、次には、*P. pastoris* URA3遺伝子の塩基配列を決定し、さらに特性化するために適したサブクローンを構成することが可能になった。

pPU201をEcoRVとPstIによって消化させ、URA3遺伝子を含む約4.0 kbフラグメントを単離し、これをpUC19中にSmaIとPstI部位において結合することによって、プラスミドpPU202 (図7) を形成した。pPU202をそれぞれ、*SacI*、*KpnI*及びEcoRIによって消化させ、大量 (200 μl) に再結合させることによって、プラスミドpPU203、pPU205及びpPU206 (図8-10) を形成した。クローン化*P. pastoris* ゲノムインサートDNAフラグメント中並びにpPU202のpUC19ポリリンカー中にこれらの酵素の各々の認識部位が存在するので、この方法はpPU202中のこれらの部位の間のDNAの便利な除去を可能にした。生ずるプラスミドを次に用いて、大腸菌株CSH-28を形質転換させて、各欠失構造体がpyrF突然変異を相補するか否かを判定した。この結果はpPU203とpPU205がウラシルを含まない合成培地上でpyrF菌株の増殖を可能にする機能URA3遺伝子を含むが、pPU206は含まないことを実証した。これらの研究結果はpPU201における*P. pastoris* URA3遺伝子の地図

作成 (mapped) 位置と一致する。

推定の (putative) URA3遺伝子を有するP. バストリスゲノムDNAフラグメントのサブクローンをSangerジデオキシ法によって塩基配列決定した [Sanger等のProc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467 (1977)を参照のこと]。この構造遺伝子と約100bpのフランキング配列との塩基配列を両方向において調べて、配列番号3に表す。クローン化P. バストリスURA3遺伝子から誘導されるアミノ酸配列 (配列番号4を参照のこと) は、S. セレビジェURA3遺伝子から誘導されるアミノ酸配列との73%相同を有し、C. トロピカリスのURA3AとURA3B遺伝子から誘導されるアミノ酸配列との71%相同を有し、Kleuvero myces lactis (クロイペロミセス ラクセス) URA3遺伝子から誘導されるアミノ酸配列との72%相同を有する。

実施例VI: ビキアのIGF-1発現PEP4欠失 (PEP4⁻) 菌株の発生

A. 遺伝子添加によるIGF-1発現PEP4菌株の発生

1. P. バストリスPEP4遺伝子破壊ベクターpDR421の形成

内因性PEP4座に不完全PEP4遺伝子を加えることによる、宿主PEP4遺伝子の破壊によって、ビキア バストリスのPEP4欠失 (PEP4⁻) 菌株の発生に用いるためのプラスミドpDR421を形成した。このベクターはPEP4遺伝子の内部部分を含み、この部分はP. バストリスのPEP4菌株の形質転換に用いる場合に、PEP4座において宿主ゲノムに結合して、PEP4遺伝子の不完全な非機能性コピーを発生させる。

破壊ベクターpDR421を発生させるために、ビキアのURA3遺伝子をベクターpEP205 (pUC19配列と、pEP202から誘導される450bp BamHIフラグメントに含まれるPEP4遺伝子部分とから成る) にクローン化させた。これは、pEP205のXbaI-SphI部位 (図3参照) 中に2kb SpeI-SphI DNAフラグメントとしてpPU205からのURA3遺伝子 (図9参照) をサブクローン化することによって実施した。

プラスミドpPU205をSpeIとSphIとによって消化させ、この反応混合物を0.8%アガロースゲル上で分離させた。URA3遺伝子を含む2kb

DNAフラグメントをDE81ペーパーを用いてゲルから単離させ、溶離し、精製した。プラスミドpEP205をXbaIとSphIとによって消化させた。pPU205から単離させた2kb URA3遺伝子を含むSpeI-SphIフラグメントをXbaI/SphI消化pEP205に結合させ、この混合物を用いて大腸菌株MC1061をアンピシリン耐性に形質転換させた。アンピシリン耐性コロニーを、BamHI/SphI制限酵素消化コロニーDNAの2.7kb、0.4kb、1.9kb診断フラグメントの存在に関する分析によってスクリーニングした。形質転換体はpDR421と名付けられた正確なDNA構造を有するプラスミドを含むことが判明した (図11)。

2. IGF-1発現URA3 P. バストリス菌株 (IGF-U) のpDR421による形質転換

P. バストリスのURA3 IGF-1発現菌株、IGF-U、をpDR421によって形質転換させて、P. バストリスのPEP4⁻ IGF-1発現菌株を発生させた。

a. IGF-Uの発生

5-フルオロオロチン酸 (5-FOA) はウラシル生合成経路中間体の類似体であり、これはUra⁺菌株によって消化されるときに有害な化合物を生ずる。Ura⁺菌株によるウラシル生合成経路はある一定の段階においてブロックされるので、これらの菌株は5-FOA (細胞にとって有害な化合物を形成する) を代謝せず、このため5-FOA耐性である。これに反して、Ura⁻菌株は5-FOAを代謝し、5-FOA含有培地では生きることができない。それ故、5-FOA含有培地での細胞培養は自然突然変異によってUra⁺菌株を発生させるための方法として用いることができる [例えば、Boeke等, Mol. Gen. Genet. 197: 345-348 (1984)を参照のこと]。

IGF-1産生菌株G+IMB206S1のURA3誘導体 [この菌株の説明に関しては、ここにその全体において参考文献として関係する、1990年9月4日出版の共同に出版された米国特許出願第07/578,728号を参照のこと] は、ウラシル補充5-FOA含有培地 [0.6%酵母要素培養、2%寒天、2%グルコース、5-FOA 750mg/lとウラシル48mg/l] 中にこ

の菌株の 5×10^7 細胞を直接培養することによって形成された。30℃における1週間の培養後に、この平板上で増殖するIGF-Uと名付けられたコロニーを単離した。増殖のためにウラシルを必要とする、このコロニーはビキア バストリスのURA3菌株を相補することができなかった。

b. IGF-Uの形質転換

pDR421約200μgをBgIIIによって消化させ、標準スフェロプラス形式形質転換方法によるIGF-Uの形質転換に用いた。形質転換体を6日間わたるウラシル不含有培地で増殖するか否かによって選択した。

3. 形質転換体の特性化

a. 形質転換体カルボキシペプチダーゼY活性の分析

Ura⁺形質転換体を、次に実施例Iに述べるようなコロニーオーバーレイ比色検査方法によって、カルボキシペプチダーゼY活性に関して分析した。この分析結果に基づいて低カルボキシペプチダーゼY活性を有するように思われるUra⁺形質転換体のコロニー (すなわち、PEP4⁻コロニーを指示する強い赤色を発色できなかったコロニー) を単離し、マスタープレート (master plate) に移し、対照コロニーと共に継代培養し、オーバーレイ分析法を用いて再スクリーニングした。再度強い赤色を発色することができなかった1コロニーをM+IMB206S1と名付けた。

b. 1リットル発酵と10リットル発酵とで増殖したP. バストリスのIGF-1発現PEP4菌株の完全なIGF-1発現レベルの分析

1. P. バストリスのIGF-1発現PEP4菌株の発酵

実施例VI. A. 2. b. に述べたように形成されたP. バストリスのIGF-1発現PEP4菌株、M+IMB206S1をグリセロールバッチ増殖槽、制限グリセロール供給バッチ相及びメタノール供給バッチ相から成る三相プロトコールによる1リットル発酵と10リットル発酵において増殖させた。P. バストリスのPEP4 IGF-1発現菌株間の完全IGF-1発現レベルを比較するために、IGF-1遺伝子発現カセットの4コピーと6コピーをそれぞれ含む、P. バストリスの2増PEP4菌株、G+IMB204S14とG+IMB206S1をも次のように比較可能な発酵において増殖させた。

1リットル発酵プロトコール

2リットル発酵器 (Biolafitte, ニュージャージー州, プリンストン) に最少培地 900ml (85%リン酸 21ml, 硫酸カルシウム2H₂O 0.9gと、硫酸カリウム 14.3gと、硫酸マグネシウム11.7gと、水酸化カリウム 3.2g) とグリセロール30gとを加えて、オートクレーブ処理した。滅菌後に、PTM₁微量 (trace) 塩溶液 (硫酸第二銅・5H₂O 8g/l、ヨウ化ナトリウム 0.08g/l、硫酸マンガン・H₂O 3g/l、モリブデン酸ナトリウム・2H₂O 0.2g/l、ホウ酸 0.02g/l、塩化コバルト 0.5g/l、塩化亜鉛 20g/l、硫酸第一鉄・H₂O 65g/l、ビオチン 0.2g/l、及び硫酸 5ml) 4mlを発酵器に加え、pHを濃NH₄OHによって5に調節した。pHは0.1%Struktoji J673増泡剤 (起泡を制御するために加える) を含む50%NH₄OHの添加によって調節した。温度を30℃に維持し、溶解酸素を攪拌、通気、又は酸素を含む空気供給 (feed) の補充の強化によって飽和の20%以上に維持した。

2%グリセロールを含む緩衝化 (buffered) YNB中で30℃において一晩増殖させた細胞から接種物を形成した。発酵器にOD₆₀₀ 2~8までに増殖させた培養細胞40~70mlを接種し、バッチ増殖法 (growth regime) をグリセロールが消耗されるまで18~24時間続けた。溶解酸素濃度の増加によって指示されるグリセロール消耗の時点で、グリセロール供給 (50%w/vグリセロール プラス 12ml/l PTM₁) を10ml/時で開始した。pH5.0発酵では、培養物のpHを発酵を通して5に維持した。低pH発酵 (すなわち、pH2.8又はpH3.5) では、グリセロール供給の開始後に、pHコントローラーの設定点を所望のpHに調節した。4時間後に、細胞代謝の結果として培養物のpHはこの設定点値にまで低下した。この低いpHを発酵の残りを通して維持した。次にグリセロール供給を停止し、メタノール供給 (100%メタノール プラス PTM₁ 12ml/l) を2ml/時の速度で開始した。3時間のメタノール供給後に、供給速度を6ml/時に高め、この速度を発酵の残りに対して維持した。メタノール供給の開始から72時間後

に、容器を回収した。

発酵を NH_4OH 、消泡剤、グリセロール、メタノール、エタノール、及び温度調整レベルに関して実施例 I に述べたように監視した。ブロス (broth) サンプルと細胞サンプルも実施例 I に述べたように発酵を通して回収した。

10リットル発酵プロトコール

5. 5リットルの全量で、10X基本塩 (85%リン酸 42ml/l、硫酸カルシウム・ $2\text{H}_2\text{O}$ 1.8g/l、硫酸カリウム 28.6g/l、硫酸マグネシウム 23.4g/l、水酸化カリウム 6.5g/l) 3.5リットルとグリセロール 220gとを含む15リットル発酵器を滅菌した。発酵器が冷却した後に、PTM₁微量塩 24mlを加え、pHを2%水酸化アンモニウムの添加によって5に調節した。pHは同溶液の添加によって調節した。起泡はStruktol J673の5%溶液の添加によって制御した。温度は30℃に維持し、溶解酸素は復元、通気、反応器圧の強化によって又は酸素を含む空気供給の補充の強化によって飽和の20%以上に維持した。2%グリセロールを含む酵母培養基 (YNB: KH_2PO_4 11.5g/L、 K_2HPO_4 2.66g/L、酵母窒素塩基 6.7g/L、pH6) 中で一晩増殖させた細胞から接種物を作製した。発酵器にOD₆₀₀ 2~8までに増殖させた培養細胞 500~700mlを接種し、パッチ増殖法を18~24時間続けた。溶解酸素濃度の増加によって指示されるグリセロール消費の時点で、グリセロール供給 (50%w/vグリセロール プラス 12ml/L PTM₁) を100ml/時で開始し、4時間続けた。次にグリセロール供給を停止し、メタノール供給 (100%メタノール プラス 12ml/L PTM₁) を20ml/時の速度で開始した。メタノール供給の開始と共に、pHコントローラーの設定点を2.8に調節した。次にpHは細胞代謝の結果として、設定点値まで徐々に低下した。4時間のメタノール供給後に、メタノール供給速度を60ml/時に高め、この速度に全体で約72時間維持し、72時間目に容積を回収した。

ii. PEP4 IGF-1発現菌株間のIGF-1発現レベル

P. バストリスの組換え体 IGF-1分泌菌株の発酵で産生される数形式の I

-1を0.02M 酢酸ナトリウム、pH5.5、プラス 1M NaClの2mlによって溶出した。溶出液の最初の1mlは全IGF-1の75~80%を含み、通常は回収された唯一の溶出液であった。カラムを次に100%メタノール 2mlによる洗浄によって再生し、それによって再使用のために利用可能にした。

ピキアー産生 IGF-1のレベルの定量的ために、既知量の標準 IGF-1 (Amgen, カリフォルニア州、オークス) をHPLCカラムに注入し、クロマトグラムの対応ピーク下の面積を測定した。面積をHPLCカラムに負荷した IGF-1の μg に対してプロットすることによって、標準曲線を形成した。HPLCクロマトグラム ピーク下の面積をIGF-1濃度に換算するために用いる相関係数を標準曲線から算出した。検出器を0.05AUFsと215nmの波長にセットした場合に、相関係数はカラムに注入したIGF-1について350単位/ μg であった。この情報を用いて、洗浄されたブロス サンプル中に存在する正確に折り畳まれた、完全なモノマーIGF-1の濃度を、サンプルのHPLC分析からのクロマトグラムの対応ピーク下の面積の測定によって、算出することが可能であった。この相関係数を用いて、ニックが入ったIGF-1種の大体の濃度も同様に算出した。しかし、ニックが入った種の絶対濃度は完全IGF-1とニックが入ったIGF-1の固有相関係数の差に依存して変動する。

1リットル発酵の結果

該PEP4 IGF-1発現菌株の1リットル低pH (pH2.8) 発酵は一貫して、PEP4 IGF-1発現菌株の1リットル低pH発酵 (~180-190mg/L) よりも多量の総モノマー (真正 プラス ニックド) IGF-1 (~200-250mg/L) を生成した。さらに、該PEP4菌株のブロス中の真正IGF-1の割合はPEP4菌株のブロスにおける割合 (65%) よりも多少高かった (77%)。しかし、該PEP4菌株とPEP4菌株とのモノマーIGF-1産生レベルの非常に大きい明白な差が、これらの菌株のpH5.0発酵において検出された。PEP4 IGF-1発現菌株、G+1MB204S14とG+1MB206S1との1リットルpH5.0発酵においてはIGF-1は本質的に検出されなかった。この結果は、PEP4菌株の発酵において産生

GF-1の一つは、ジスルフィド結合によって一様に維持される2個以上のIGF-1分子フラグメントから成る、ニックが入った (nicked) 種である。これらのフラグメントはIGF-1分子のアミノ酸バックボーンの1個以上のペプチド結合のタンパク分解開裂によって形成された。ニックドIGF-1分子と完全IGF-1分子とは見かけの分子量 [非還元性条件下で、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって測定] に基づいては識別不能であるので、これらの種は非還元性条件下での逆相HPLCによって、また還元性条件下 (すなわち、例えばジチオスレイトールのような還元剤の存在下) でのSDS-PAGEによって分離することができる。ニックが入ったIGF-1のフラグメントを保持するジスルフィド結合の還元は、完全な分子よりも小さい分子量を有する、タンパク分解によって生ずる個々のフラグメントを遊離させる。

IGF-1発現レベルの定量

細胞を含まないブロスにおけるニックドIGF-1と真正の (authentic) (完全な、正確に折り畳まれた、モノマーの) IGF-1の収量を定量逆相HPLCによって測定した。用いたHPLC系は、C18カラムの代わりにVydac C4カラム (0.46x5cm) を用いた以外は、実施例IVで述べた系と同じであった。1%/分勾配の25~42%移動相をカラムに1ml/分の流速で17分間通して、このカラムからサンプルを溶出した。検出器を0.05吸光度単位フルスケール (AUFs) にセットし、最大感度のために215nmの波長を用いた。

P. バストリス ブロス中の真正IGF-1種とニックが入ったIGF-1種とをHPLCによって識別するために、ブロス サンプルをHPLCカラムに負荷する前にブロスから若干の内因性P. バストリス汚染物を除去することによって、ブロスを洗浄することが必要であった。これは、このブロスを0.25mlカラムに含まれるスルホプロピルベーズドカチオン交換樹脂に通すことによって達せられた。この樹脂を最初に0.2M酢酸によって洗浄し、次に0.02M酢酸 2mlと平衡化させた。一定量の細胞を含まない粗ブロス (1ml) をカラムに負荷し、このカラムを0.02M酢酸 1mlによって洗浄した。IGF

される真正IGF-1がpH5.0においては大変強いタンパク分解を受けるが、低いpHではごく限定されたタンパク分解を受けるに過ぎないことを示す。これに反して、該PEP4 IGF-1発現菌株M+1MB206S1の1リットルpH5.0発酵は少なくとも200mgのモノマーIGF-1/Iを生じ、その約80%は真正IGF-1であった。従って、該PEP4 IGF-1発現菌株はPEP4 IGF-1発現菌株に比べてpH5.0における真正IGF-1の産生に関して有意に改良され、pH2.8における真正IGF-1の産生に関して多少改良されたように見える。

10リットル発酵の結果

P. バストリスの該PEP4 IGF-1発現菌株の10リットル発酵は、PEP4 IGF-1発現菌株の10リットル発酵 (~170mg/l) よりも多量の総モノマーIGF-1 (~200mg/l) を生成した。

該PEP4菌株とPEP4菌株の10リットル発酵において産生される総モノマーIGF-1の組成も異なった。該PEP4菌株M+1MB206S1の10リットル発酵における総モノマーIGF-1の75% (164mg/l) 以上が真正IGF-1であったが、PEP4菌株G+1MB204S14の10リットル発酵における総モノマーIGF-1の約50% (88mg/l) のみが真正IGF-1であった。

さらに、該PEP4菌株の発酵における細胞収率はPEP4菌株の発酵における細胞収率よりも~30%低かったので、真正IGF-1の細胞当たりの収率はPEP4菌株の発酵において非常に強化された。該PEP4菌株の発酵における細胞収率が低い結果として、該PEP4菌株の発酵から多量の細胞を含まないブロスが回収された (PEP4菌株の発酵から回収される細胞を含まないブロスの量に比べて)。これは該PEP4菌株の発酵からの分泌IGF-1量に比べて、この回収を生ずる (PEP4菌株の発酵から回収される分泌IGF-1量に比べて)。

上記結果は、該PEP4 IGF-1発現菌株が真正IGF-1の産生に関して、PEP4 IGF-1発現菌株に比べて、大規模に改良されることを実証する。

B. 遺伝子置換によるIGF-1発現PEP4菌株の発現

1. P. バストリス遺伝子破壊ベクターpDR601とpDR602の形成
ベクターpDR601とpDR602とを、欠陥PEP4遺伝子による内因性PEP4遺伝子の置換による宿主PEP4遺伝子の破壊によるPEP4欠陥(PEP4⁻)菌株の発生に用いた。このベクターは下記のように数工程で形成した(図13の図も参照のこと)。

pUC19配列と、pEP202からのクローン化P. バストリスPEP4遺伝子とから成るプラスミドpEP301(図4参照)をNcoIによって開裂し、次にDNAをエタノールによって沈殿させ、回収し、再懸濁させ、連結反応混合物中に連結させた。この消化と連結は、0.5 kb NcoIフラグメントに含まれるPEP4遺伝子の内部部分を効果的に除去した。連結後に、DNAをBglIIによって消化させ、残りの順プラスミドを直鎖状化し、このDNAを用いて、大腸菌株MC1061を形質転換させる。アンピシリン耐性コロニーを選択して、コロニーDNAの制限酵素消化物の分析によって、0.5 kb NcoIフラグメントの存在に関してスクリーニングした。~0.5 kb NcoIフラグメントを有さない欠陥PEP4遺伝子を含む正確なプラスミドはpDL321と名付けた。第2プラスミド、pUC19XXは、SmaIとHincIIとによってpUC19を開裂させ、再連結させ、BamHIとXbaI部位を含むポリリンカー部分を効果的に除去することによって形成した。次に、プラスミドpUC19XXをSacIとEcoRIとによって切断し、~10 ngをpDL321のSacI/EcoRI 2.2 kbフラグメントの~50 ngと結合させた。このフラグメントはゲル精製され、DE81ペーパーによって単離されたものである。この結合ミックスを用いて、MC1061細胞を形質転換させ、BglII/XbaI消化コロニーDNAの分析によってアンピシリン耐性コロニーをスクリーニングした。正確な消化物パターンを示すプラスミドはpDL322と名付けた。

次にpDL322をXbaIによって切断し、10 ngを配列5'-CTAGCGGCCG-3'のオリゴヌクレオチドリンカー10 ngと結合させた。このリンカーはXbaI部位に結合されたときにXbaI部位を破壊させ、独特のNotIを形成した。この結合ミックスを用いて、MC1061細胞を形質転換

させた。アンピシリン耐性コロニーをNotI消化コロニーDNAの分析によってスクリーニングした。正確なプラスミドはpDL323と名付けた。

ベクターpDR601とpDR602とを形成するために、ピキアURA3遺伝子を下記のようにpDL323中に挿入した。プラスミドpPU205(図9参照)をPvuIIとAatIによって消化させ、約2.5 kb PvuIIフラグメント上のURA3遺伝子を遊離させた。この消化物を0.8%ガロースゲル上で分離させた。~2.5 kbフラグメントをDE81ペーパーを用いてゲルから単離させ、薄出し、精製した。プラスミドpDL323をEcoRVによる切断によって直鎖状化した。この直鎖状化プラスミド(~10 ng)をpDU205 noURA3含有PvuIIフラグメントと結合させて、挿入されるURA3遺伝子の配向に依存して、pDR601とpDR602とを形成した(それぞれ、図14と15を参照のこと)。

2. pDR601とpDR602とによるIGF-Uの形質転換

URA3 IGF-1発現P. バストリス菌株IGF-U(実施例VII, A, 2. aを参照のこと)をpDR601とpDR602とから誘導されたDNAの直鎖状フラグメントによって形質転換させた。この直鎖状フラグメントは各側でPEP4遺伝子の一部をコードするDNAによってフランクされるURA3遺伝子を含む。このフラグメントの末端とPEP4遺伝子との相溶性はこのフラグメントのPEP4座における組込みを刺激し、遺伝子置換イベントを生じた。宿主ゲノム中へのいずれのフラグメントの安定な組込みも、フラグメントに含まれるURA3遺伝子の存在のために原形質転換を生じた。この形質転換は下記のように実施した：

pDR601とpDR602の両方をNotIとBstEIIとによって消化させることによって、各側でPEP4遺伝子の一部をコードするDNAによってフランクされるURA3遺伝子から成る直鎖状DNAフラグメント(~4.0 kb長さ)を得た。消化されたDNA(20 µg)を用いて、標準スフェロプラスト方法によって菌株IGF-Uを形質転換させた。再生培地上で増殖し、YEPD培地上に融培養した形質転換体から単離したUra⁺コロニーを実施例IIに述べたオーバーレイ方法によってカルボキシペプチダーゼY活性に関してス

クリーニングした。対照コロニーに比べて赤色を呈しなかったコロニーをサザンブロットハイブリッド形成による分析のために選択した。

3. 形質転換体からのDNAのサザンブロットハイブリッド形成

選択した形質転換体からHofmanとWinstonの方法[Gene, 57: 267-272 (1987)]を用いて、ゲノムDNAを単離した。各菌株からのゲノムDNAをBstEIIによって消化させた。この処理はpDR601又はpDR602のフラグメントの組込み領域を含むPEP4座の一部を遊離させる。それ故、この領域のサイズはIGF-Uのゲノム中への形質転換用DNAの適切な組込みに特徴的である。消化されたDNAに対して0.8%アガロースゲル上で電気泳動を実施し、ニトロセルロースフィルターにこのDNAをブロットした。このフィルターをP. バストリスPEP4遺伝子の一部を含むpEP301の放射能標識した1.4 kb XbaI/EcoRVフラグメントによって、標準方法を用いて、ハイブリッド形成した(Maniatis, T., Fritsch, E. F. 及びSambrook, J. Molecular Cloning, A Laboratory Manual 385-388頁, Cold Spring Harbor press, 米国ニューヨーク州, コールドスプリングハーバー (1982))。ハイブリッド形成は50%ホルムアミド、6XS SC、5XDenhardt 溶液、20mM Tris HCl, pH8.0、1mM EDTA、0.1% SDS及び100 µg/ml サケ精子DNAを含む溶液中で37℃において実施した。次にフィルターを1xSSC、0.1% SDS中で3回(1回の洗浄につき10分間)、次に0.5xSSC、0.1% SDS中で65℃において1時間洗浄した。比較用対照としては、P. バストリス菌株GS115、PEP4菌株、からのゲノムDNAをこの分析に含めた。

GS115からのゲノムDNAのBstEIIによる消化は4.4 kbフラグメントを生じ、これはブローブ中に含まれるPEP4遺伝子の一部にハイブリッド化した。これに反して、このブローブは少なくとも二つの形質転換体、IGFU2601-5とIGFU2602-5とからのDNAの6.9 kbフラグメントにハイブリッド形成した。対照PEP4座に比べて大きいサイズの形質転換体PEP4座(6.9対4.4 kb)は、その構造領域内にURA3遺伝子を有する非

機能性PEP4遺伝子による宿主PEP4遺伝子の置換と一致した。

これらの結果から、菌株IGFU2601-5とIGFU2602-5とが遺伝子置換による宿主菌株IGF-UのPEP4遺伝子の破壊によって生ずる機つかのPEP4菌株の例であると結論された。

実施例VII: "POPOUT"ベクターを用いるPEP4ピキア菌株の形成

1. P. バストリス遺伝子破壊ベクターpDL521の形成

"pop-in/pop-out"方法による宿主PEP4遺伝子の破壊によるP. バストリスのPEP4欠陥(PEP4⁻)菌株の発生に、ベクターpDL521を用いた。この方法では、小欠陥を含む欠陥PEP4遺伝子を宿主PEP4座に加え、PEP4座から機能性PEP4遺伝子を除去する(すなわち、pop-in/pop-out)。

pDL521は2工程で形成した。最初に、pDL323の2.2 kb EcoRI/SacIフラグメントと、pPU205の2.2 kb SacI/PstIフラグメントと、pUC19の2.7 kb EcoRI/PstIフラグメントとを三方向結合(three-way ligation)によって結合させて、中間体プラスミド、pDL501を形成した。これらの3フラグメントは次のようにして得た。P. バストリスURA3遺伝子を含むpPU205(図9)をPstIとSacIとによって消化させた。URA3遺伝子を含む2.2 kb PstI-SacIフラグメントをゲル単離し、DE81ペーパーを用いて精製した。完全PEP4遺伝子中に存在する0.5 kb NcoIフラグメントを欠いた欠陥PEP4遺伝子を含むプラスミドpDL323(図13参照のこと)をEcoRIとSacIとによって消化させた。欠陥PEP4遺伝子を含む2.2 kbフラグメントをゲル単離させ、DE81ペーパーを用いて精製した。pUC19をEcoRIとPstIとによって消化させた。3フラグメント(pUC19のEcoRI/PstI-消化フラグメント 0.02 µg、pPU205の2.2 kb PstI/SacIフラグメント 0.02 µg、pDL323の2.2 kb EcoRI/SacIフラグメント 0.02 µg)の三方向結合で結合させた。この結合ミックスを用いて、大腸菌株MC1061を形質転換させた。アンピシリン耐性コロニーをNcoI消化コロニーDNAの分析によ

でスクリーニングした。正確に結合したフラグメントをpDL501と名付けた。次にpDL501をS_{ac}Iによって消化させ、ウシ アルカリホスファターゼによって処理し、0.02μgをS_{ac}I消化pEP202から単離された1.9kb S_{ac}Iフラグメント0.02μgと結合させ、DE81ペーパーを用いて精製した。これはpDL501中の欠陥PEP4遺伝子の3'末端にさらにPEP4フランキンゲン配列を加えて、P.バストリス宿主IGF-Uの形質転換中の内因性PEP4遺伝子による組換えのためにさらに多量の相同配列を挿入した。この結合ミックスを用いて、大腸菌株MC1061を形質転換させた。アンピシリン耐性コロニーからのDNAをB_{gl}IIとS_{pe}Iとによって消化させ、pEP202からの追加S_{ac}Iフラグメントの存在を示す特徴的な0.8kbフラグメントの存在に関してスクリーニングした。正確なプラスミドをpDL521と名付けた(図16参照)。

2. GS4-2のpDL521による形質転換

a. GS4-2の発生

pop-outプロセスによるPEP4菌株の発生に宿主として、P.バストリスのURA3菌株が必要であった。ウラシルを補充した5-フルオロオロチン酸培地(0.67%酵母窒素塩基、2%奪天、2%グルコース、750ng 5-FOA/1)及び48mg ウラシル/1)における普通の(general)HISA P.バストリス宿主菌株GS115の10⁸細胞の直接培養によってURA3菌株を発生させた。30℃における1週間のインキュベーション後に、平板上で増殖したコロニーを単離した。このHis⁺Ura⁺菌株をGS4-2と名付けた。

b. GS4-2の形質転換とPEP4菌株の発生

プラスミドpDL521をNotIによる消化によって直鎖状化した。PEP4遺伝子から配列が欠失して、この遺伝子を不完全にする部位の5'に隣接して、NotI部位を配置する。NotIフラグメントの両端はGS4-2の内因性PEP4遺伝子の配列に相周であり、このことはPEP4座における相同的組換えによるフラグメントの組み込みを促進する。

His⁺Ura⁺菌株GS4-2を、スフェロプラスト方法に従って、NotI

による消化によって直鎖状化したpDL521 20μgによって形質転換させた。形質転換体をそれらがウラシルを欠いた培地で増殖するか否かによって選択した。これらの形質転換体の12個を取り上げ、これらの形質転換体から単離した(実施例VII, B, 3に述べるように)ゲノムDNAをS_{ac}Iによって切断し、0.8%アガロースゲル上で電気泳動を受けさせた。このDNAをニトロセルロースフィルターに移し、PEP4遺伝子の放射能標識1.2kb EcoRV/XbaIフラグメントによって調べた。ゲノムDNAのサザンブロットハイブリッド化パターンに基づいて、PEP4座に組込まれたpDL521を有するように見える2菌株、GS4-2521-3とGS4-2521-4とをさらに選択するために選んだ。これらの菌株はURA3マーカー遺伝子を含有し、このマーカー遺伝子の片側には無傷の、完全なPEP4遺伝子を有し、他方の側には欠陥PEP4遺伝子(配列の0.5kbを欠く)を有する。この形態のPEP4座はPEP4遺伝子の2コピーの間の組換えを可能にし、PEP4遺伝子の一方とURA3遺伝子との脱離を生ずる(すなわち、pop-out)。この2種のPEP4遺伝子のいずれの一方もこの組換えイベントから脱離する(beat back)ことができる。2種PEP4遺伝子間の組換えが生ずるかどうかが、また何時生ずるかを確認するために、菌株GS4-2521-3とGS4-2521-4とを5-FOAを含むYPD培地上で連続10倍希釈方法で培養した。Ura⁺菌株のみが5-FOAの存在下で増殖し、従って、このような培地での増殖が所望の組換えイベントの発生を裏証する。5-FOA含有培地で増殖することができる菌株はPEP4遺伝子の2コピー間の組換えによって発生するウラシル要求型であった。Ura⁺コロニーは30℃における1週間の培養後に5-FOA含有平板上に出現した：これらのコロニーの中の10コロニーはGS4-2521-3から誘導されたものであり、これらのコロニーの中の14コロニーはGS4-2521-4から誘導されたものである。

3. 形質転換体の特性化

Ura⁺形質転換体コロニーの14コロニーを精製し、各々からゲノムDNAを形成し、EcoRIとEcoRVとによって消化させ、0.8%アガロースゲル上で電気泳動を受けさせ、ニトロセルロース上にブロットし、P.バストリス

PEP4遺伝子の放射能標識1.2kb XbaI/EcoRVフラグメントによってハイブリッド形成した。このようにして分析した14単離体の中の7単離体からのDNAは完全なPEP4遺伝子に存在する0.5kbの配列を欠いた欠陥PEP4遺伝子のみから成るPEP4座と一致するハイブリッド化プロファイルを示した。これらの菌株の中の2個がGS4-2521-3/7とGS4-2521-4/1であった。

実施例VIII: P.バストリスのPRB-1遺伝子の一部のクローニング

プロテイナーゼB遺伝子、PRB-1はS.セレビジェにおける液泡セリンエンドプロテアーゼをコードする[Moehle等, Mol. Cell. Bio. 7:4390-4399 (1987)]。同等の遺伝子の一部をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)遺伝子増幅法を用いてP.バストリスからクローン化した[例えば、Gould等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1934-1938 (1989)を参照のこと]。複製体に維持される、プロテイナーゼBタンパク質の領域をコードするPRB-1遺伝子配列への相同性を有する簡便オリゴヌクレオチド(Moehle等, 上記文献)をP.バストリスPRB-1 DNAのPCR増幅にプライマーとして用いるために合成した。このオリゴヌクレオチドは次の配列を有した：

オリゴヌクレオチド 1:

5'-GATAGAACTCTGCAG GGT AAT GGT CAT GGT ACT CAT TGT GC-3'

オリゴヌクレオチド 2:

5'-GATCGCATGC AAT CCT GCA ACA TGT GGA GAT GCC AT-3'

増幅されたDNAフラグメントのシャトル プラスミドへのサブクローニングを促進するために、各オリゴヌクレオチドはその5'末端に1個以上の制限エンドヌクレアーゼ認識部位をも含んだ：オリゴヌクレオチド 2ではSphI部位、オリゴヌクレオチド 1ではPstIとEcoRIの両部位。

PCR反応培地はT. E. (10mM Tris HCl, 1mM EDTA) 2μl中のP.バストリス(NRRL Y-11430株)ゲノムDNA 100ngと、オリゴヌクレオチド 1 10μlと、オリゴヌクレオチド 2 10μlと、dGTP, dCTP, dATP及びdTTPの1.25mM溶液 18μlと、10×緩衝液(500mM KCl, 100mM Tris·HCl, pH8.3, 15mM MgCl₂) 10μlと、0.1%ゼラチンと、水 70μlと、5単位/μl Taq DNAポリメラーゼ 0.5μlとから成るものであった。溶液を94℃において2分間加熱した。31回反復されるPCR増幅反応は96℃における2分間の変性と、50℃における1分間のアニーリングと、72℃における3.5分間の重合を含むものであった。

このPCRの生成物をアガロースゲル上の電気泳動に供し、オリゴヌクレオチド 1と2に対応する位置間のPRB-1遺伝子の増幅生成物に予想されるサイズ(〜500bp)のフラグメントをDE81ペーパー上で単離させ、EcoIとSphIとによって消化させ、アガロースゲル上の電気泳動に供した。500bpフラグメントをDE81ペーパーによって単離させ、pUC19 10ngに結合させた。このpUC19はポリリンカー中でEcoIとSphIとによって消化されて、直鎖状化されたものである。この結合ミックスを用いて、大腸菌MC1061細胞を形質転換させた。アンピシリン耐性の形質転換体からの制限酵素消化プラスミドDNAを正確な500bp EcoI-SphIフラグメントの存在に関して分析した。1コロニーのみがpPRBPPと名付けられた、正確なプラスミドを含有した。このプラスミドのピナキ部分の制限地図を図17に示す。

pPRBPPに含まれるP.バストリスPRB-1遺伝子のクローニング部分の配列をSangerジデオキシ法を用いて発生させ(Sanger等, 上記文献)、配列番号5に示す。P.バストリスPRB-1遺伝子のこの配列はS.セレビジェPRB-1遺伝子の配列に対して74%の相同性を有する。

実施例IX: P.バストリスのPRB-1菌株の発生

P.バストリスのPRB-1菌株の発生に用いるために、プラスミドpDR911を形成した。このベクターはP.バストリスのPRB-1菌株の内部部分を

含み、これはP. バストリスのPRB-1菌株の形質転換に用いる場合に、宿主ゲノムにPRB-1座において挿入され、PRB-1遺伝子の2種の不完全な非機能性コピーを形成する。ベクターpDR911はP. バストリスのURA3宿主菌株に選択性マーカーとして用いるために完全な機能性P. バストリス URA3遺伝子を含む。

A. pDR911の形成

pPRBPP中のP. バストリスのPRB-1遺伝子フラグメントをPst IとSph IとによるpPRBPPの制限消化によって単離させた。この反応混合物を0.8%アガロースゲル上に負荷させ、0.5 kbフラグメントをDE81ペーパーによって精製した。

この0.5 kbフラグメントを直鎖状のプラスミドpPU203に、P. バストリスURA3含有pUCベードプラスミドに結合させた(図8参照)。プラスミドpPU203をSph IとPst Iによる開裂によって直鎖状化し、~10 ngをピキアDNAフラグメント~100 ngと結合させた。この結合混合物を用いて大腸菌株MC1061をアンピシリン耐性に形質転換させた。アンピシリン耐性コロニーを特徴的なフラグメントに関するPst I/Sph I消化コロニーDNAの分析によってスクリーニングした。正確なプラスミドをpDR911と名付けた(図18参照)。

B. GB4-2のpDR911による形質転換

P. バストリスのPRB-1菌株を形成するために、BgIIIによる消化によって直鎖状化されたpDR911による標準スフェロプラスト形質転換によって、GS4-2を形質転換させることができる。Ura⁺形質転換体からのDNAのサザンブロットハイブリッド化は、PRB-1座の破壊によって形成されるPRB-1菌株の確認を可能にした。形質転換体のプロテイナーゼB活性分析[例えば、Jones等のGenetics 102:665-677(1982)を参照のこと]は、菌株のプロテイナーゼB欠失をさらに実証する。

C. P. バストリスのprb-1, pep4菌株の発生

GS4-2521-4の単離体であるP. バストリスGS4-2521-4-5のpep4, ura3, his4菌株のPRB-1遺伝子(実施例VII参照)

を、BgIIIによる開裂によって直鎖状化されたベクターpDR911による形質転換によって破壊した。Ura⁺表現型を有する形質転換体を選択して、サザンブロットハイブリッド形成によって分析した。予想されるハイブリッド形成パターンを示す特定形質転換体をMG18と名付けた。この菌株をIGF-1の発現のための宿主として用いた。IGF-1発現菌株をC+IGF816S1と名付けた。

本発明をそのある一定の好ましい実施態様に関して詳述したが、ここに述べ、特許請求する本発明の要旨と範囲内で変化和変更が行われることは理解されよう。

配列表

配列番号1:

(1) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 2032塩基対

(B) 配列の型: 複製

(C) 種の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(2) 配列の塩基: cDNA

(a) 特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 236...1468

(b) 特徴:

(A) 特徴を表す記号: 成熟ペプチド

(B) 存在位置: 236...1468

(ii) 配列: 配列番号1:

```
GAATTCATAA TCGTGGGATT AGGTATGCTT CCGGAATAGG AATATGCTTT TGCGGCGATT      60
AATCGACCTT GCTTATATG GTAAGTACTT TGACCGATAA GCTGGCAACT ATTAGAACAA      120
AAGCAAGCCA GCTTCTTTTA TCTGTAACTC TGTGGAAGCA AGCATCTTTA CTAGAGAACAA      180
TCTAAGCATT TTACATCTTT AGAGTTTCAT TTCTCAATTA CTGATATCA ATTAAAGG      240
ATG ATA TTT GAC GGT ACT AGG ATG TCA ATT GCG ATT GGT TTT CTC TCT      288
Met Ile Phe Asp Gly Thr Thr Met Ser Ile Ala Ile Gly Leu Leu Ser
1      5      10      15
ACT CTA GGT ATT GGT GCT GAA GCG AAA GTT CAT TCT GCT AAG ATA CAC      336
Thr Leu Gly Ile Gly Ala Gly Val Val Met Ser Ala Lys Ile Met
20      25      30
AAG CAT CCA GTC TCA GAA ACT TTA AAA GAG GCG AAT TTT GCG CAG TAT      384
Lys Met Phe Val Ser Gly Thr Leu Lys Gly Ala Asn Phe Gly Gln Tyr
35      40      45
GTC TCT GCT CTG GAA CAT AAA TAT GTT TCT TCT TTC AAC GAA CAA AAT      432
Val Ser Ala Leu Glu His Lys Tyr Val Ser Leu Phe Asn Glu Gln Asn
50      55      60
GCT TGT TCC AAG TCC AAT TTT ATG TCT CAG CAA CAT GGT TTT GCG GTT      480
Ala Leu Ser Lys Ser Asn Phe Met Ser Gln Gln Asp Gly Phe Ala Val
65      70      75      80
```

```
GAA GCT TCG CAT GAT GCT CCA CTT ACA AAG TAT CTT AAC GCT CAG TAT      926
Glu Ala Ser His Asp Ala Pro Leu Thr Asn Tyr Leu Asn Ala Gln Tyr
85      90      95
TTT AGT GAG GTA TCA TTA GGT AGC GGT CCA GAA TCG TTC AAG GTG ATT      974
Phe Thr Glu Val Ser Leu Gly Thr Pro Gln Ser Phe Lys Val Ile
100      105      110
CTT GAC ACA GGA TCC TCC AAT TTA TCG GTT GGT AGC AAA GAT TGT GGA      1022
Leu Asp Thr Gly Ser Ser Asn Leu Trp Val Pro Ser Lys Asp Cys Gly
115      120      125
TCA TTA GCT TCC TTC TTG CAT GCT AAG TAT GAC GAT GAT GAG TCT TCT      1070
Ser Leu Ala Cys Phe Leu His Ala Lys Tyr Asp His Asp Glu Ser Ser
130      135      140
ACT TAT AAG AAG AAT GGT AGT AGC TTT GAA ATT AGG TAT GGA TCC GGT      1118
Thr Tyr Lys Lys Asn Gly Ser Ser Phe Glu Ile Arg Tyr Gly Ser Gly
145      150      155
TCC ATG GAA GCG TAT GTT TCT CAG GAT GTG TTG GAA ATT GCG GAT TTT      1166
Ser Met Glu Gly Tyr Val Ser Gln Asp Val Leu Gln Ile Gly Asp Leu
160      165      170
ACC ATT CCC AAA GTT GAT TTT GCT GAG GCG ACA TCG GAG GCG GCG TTT      1214
Thr Ile Pro Leu Val Asp Phe Ala Glu Ala Thr Ser Glu Pro Gly Leu
175      180      185
GCG TTC GCT TTT GCG AAA TTT GAC GGA ATT TTG GCG CTT GGT TAT GAT      1262
Ala Phe Ala Phe Gly Lys Phe Asp Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Asp
190      195      200
TCA ATA TCA GTA AAT AAG ATT GTT GCT CCA ATT TAC AAG GCT TTG GAA      1310
Ser Ile Ser Val Asn Lys Ile Val Pro Pro Ile Tyr Lys Ala Leu Glu
205      210      215
TTA GAT CTC CTT GAC GAA CCA AAT TTT GCG TTC TAC TTG GCG GAT ACG      1358
Leu Asp Leu Leu Asp Glu Pro Lys Phe Ala Phe Tyr Leu Gly Asp Thr
220      225      230
GAC AAA GAT GAA TCC GAT GCG GCT TTG GCG ACA TTT GGT GGT CTG GAC      1406
Asp Lys Asp Glu Ser Asp Gly Gly Leu Ala Thr Phe Gly Gly Val Asp
235      240      245
AAA TCT AAG TAT GAA GGA AAG ATC ACC TCG TTG CCT CTC AEA AON AAG      1454
Lys Ser Lys Tyr Gly Glu Lys Lys Ile Thr Trp Leu Pro Val Arg Arg Lys
250      255      260
GCT TAC TGG GAG CTC TCT TTT GAT GGT GTA GGT TTG GGA TCC GAA TAT      1502
Ala Tyr Trp Glu Val Ser Phe Asp Gly Val Gly Leu Gly Ser Glu Tyr
265      270      275
GCT GAA TTT GAA AAA ACT GGT GCA GCG ATC GAC ACT GCA ACC TCA TTG      1550
Ala Glu Leu Gln Lys Thr Gly Ala Ala Ile Asp Thr Gly Thr Ser Leu
280      285      290
```

ATT GCT TTC CCG AGT GGC CTA GGT GAA ATT CTC AAT GCA GAA ATT GGT 1158
 Ile Ala Leu Pro Ser Gly Leu Ala Glu Ile Leu Asn Ala Glu Ile Gly
 305 310 315 320

GCT ACC AAG GGT TGG TGT GGT GAA TAC GCT GTG GAC TGT GAC ACT AGA 1246
 Ala Thr Lys Gly Trp Ser Gly Gln Tyr Ala Val Asp Cys Asp Thr Arg
 325 330 335

GAC TGT TTT GCA GAC TTA ACT TTA ACC TTC GCG GGT TAC AAC TTT ACC 1294
 Asp Ser Leu Pro Asp Leu Thr Thr Leu Thr Phe Ala Gly Tyr Asn Phe Thr
 340 345 350

ATT ACT CCA TAT GAC TAT ACT TTT GAG GTT TCT GGG TCA TGT ATT AGT 1342
 Ile Thr Pro Tyr Asp Tyr Thr Leu Glu Val Ser Gly Ser Cys Ile Ser
 355 360 365

GCT TTC ACC CCG ATG GAC TTT GCT GAA CCA ATA GGT GCT TTT GCA ATC 1390
 Ala Phe Thr Pro Met Asp Phe Pro Glu Pro Ile Gly Pro Leu Ala Ile
 370 375 380

ATT GGT GAC TCG TTC TTT AGA AAA TAT TAC TCA GTT TAT GAC CTA GGC 1438
 Ile Gly Asp Ser Phe Leu Arg Lys Tyr Tyr Ser Val Tyr Asp Leu Gly
 385 390 395 400

AAA GAT CCA CTA GGT TTA GCG AAG TCT ATT TAGGCAAGAA TAAAGATTGC 1486
 Lys Asp Ala Val Gly Leu Ala Lys Ser Ile 405 410

TCAGCTGAAC TTATTGCTT ACTTATCAGG TAGTCAAGAT CTACAGAAIA TATGTTTACG 1548
 TATTTTTTT TACTTTTTT CCGTAACTC ATCTTCACTA GGTGATGCT TGTGAGCTAC 1608
 GTTACAGGG GCGGATAAGT CATATGCTGT ACTGCTCAAT CAAGATTGCG CTGCTCCATT 1648
 CATAAGGTA TACAGACCC ACGTCTGCT GTTTAAATTT CTCTCTTAC TTTTGTGAAA 1728
 ATACTTTCG AAGCAATTC CAGTTTAAAT CTATCGGCTT GGTAACTAAA GGTATGCTAT 1788
 GGTGCTATAT AGTTTTGAT TTTACTTTTT ACTAATCACT TTTACAGAA AGGAACGCTT 1848
 TTCTCAAGAT CCAATATGGA CTAAATACTG GAGACGATCG GCTCTTATT TGGGTGAAAG 1908
 GCACTGGCT ACAGTAAGCG AAGACTATTC GATGATGGA CATGCTGGT CTGCTTTTCC 1968
 TTTTACCAA TCTCATTTGA CAACTTATCG CTGGGAGAG CATGCACTAG CTGGAGTTGT 2028
 AGAC 2032

Ser Ile Ser Val Asn Lys Ile Val Pro Pro Ile Tyr Lys Ala Leu Glu 210
 215 220

Leu Asp Leu Leu Asp Glu Pro Lys Phe Ala Thr Lys Leu Gly Asp Thr 225
 230 235 240

Asp Lys Asp Glu Ser Asp Gly Gly Leu Ala Thr Phe Gly Gly Val Asp 245
 250 255

Lys Ser Lys Tyr Glu Gly Lys Ile Thr Trp Leu Pro Val Arg Arg Lys 260
 265 270

Ala Tyr Trp Glu Val Ser Phe Asp Gly Val Gly Leu Gly Ser Gly Tyr 275
 280 285

Ala Glu Leu Gln Lys Thr Gly Ala Ala Ile Asp Thr Gly Thr Ser Leu 290
 295 300

Ile Ala Leu Pro Ser Gly Leu Ala Glu Ile Leu Asn Ala Glu Ile Gly 305
 310 315 320

Ala Thr Lys Gly Trp Ser Gly Gln Tyr Ala Val Asp Cys Asp Thr Arg 325
 330 335

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Thr Leu Thr Phe Ala Gly Tyr Asn Phe Thr 340
 345 350

Ile Thr Pro Tyr Asp Tyr Thr Leu Glu Val Ser Gly Ser Cys Ile Ser 355
 360 365

Ala Phe Thr Pro Met Asp Phe Pro Glu Pro Ile Gly Pro Leu Ala Ile 370
 375 380

Ile Gly Asp Ser Phe Leu Arg Lys Tyr Tyr Ser Val Tyr Asp Leu Gly 385
 390 395 400

Lys Asp Ala Val Gly Leu Ala Lys Ser Ile 405 410

配列番号2:

(1) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 410アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直線状

(2) 配列の種類: タンパク質

(3) 配列: 配列番号2:

Met Ile Phe Asp Gly Thr Thr Met Ser Ile Ala Ile Gly Leu Leu Ser 1
 5 10 15

Thr Leu Gly Ile Gly Ala Glu Ala Lys Val His Ser Ala Lys Ile His 20
 25 30

Lys His Pro Val Ser Glu Thr Leu Lys Glu Ala Asn Phe Gly Gln Tyr 35
 40 45

Val Ser Ala Leu Glu His Lys Tyr Val Ser Leu Phe Asn Glu Gln Asn 50
 55 60

Ala Leu Ser Lys Ser Asn Phe Met Ser Gln Gln Asp Gly Phe Ala Val 65
 70 75 80

Glu Ala Ser His Asp Ala Pro Leu Thr Asn Tyr Leu Asn Ala Gln Tyr 85
 90 95

Phe Thr Glu Val Ser Leu Gly Thr Pro Pro Gln Ser Phe Lys Val Ile 100
 105 110

Leu Asp Thr Gly Ser Ser Asn Leu Trp Val Pro Ser Lys Asp Cys Gly 115
 120 125

Ser Leu Ala Cys Phe Leu His Ala Lys Tyr Asp His Asp Glu Ser Ser 130
 135 140

Thr Tyr Lys Lys Asn Gly Ser Ser Phe Glu Ile Arg Tyr Gly Ser Gly 145
 150 155 160

Ser Met Glu Gly Tyr Val Ser Gln Asp Val Leu Gln Ile Gly Asp Leu 165
 170 175

Thr Ile Pro Lys Val Asp Phe Ala Glu Ala Thr Ser Glu Pro Gly Leu 180
 185 190

Ala Phe Ala Phe Gly Lys Phe Asp Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Asp 195
 200 205

配列番号3:

(1) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 2688塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 塩の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(2) 配列の種類: cDNA

(3) 特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 643...1431

(4) 特徴:

(A) 特徴を表す記号: 成熟ペプチド

(B) 存在位置: 643...1431

(5) 配列: 配列番号3:

CTGCAGAAAT GCGGAGATAA CCACCTTTGA CGAATTCAGT AAGATTCTAC AGATCATGTT 40
 TACAAATGCC ATCATCTATA AGGATGAAGA CAGTGATGTT TGGAGCTTAA GAGTGAAT 120
 GATGAGAGAA ACTACTAAGA TTAAGAGCT GTTCAGAGAA AGTCTGGAAT AGTCTGGAAC 160
 AATGAACITT ATGTACAAA ATATGGGUIT AACCTCTTAC CTGTTCATC ATAGTTGTT 240
 TTTTCTTTTG GAAACCTTGA CCAACTCTCT CACTGTGCTT GAGGAACITT TGTGCACT 300
 TGTTCATGCA GCTTCTGTC TTAGAGTCA ACTTGTGAA TGTAAATCA TTGACAGAT 360
 CTGTAAAGCA TTTGCTAACC AATCGGAGT AAGAGGCTT GAGCTTTTC ATTGTGTTT 420
 GTTCAACGAC TTTCTGCAAC TTTCTGTTT GTTTAGGCTT CAATGCTGAC ATTTGTGAT 480
 GTACTTGCTT GGGTATAGT TAGCACTTGC TCTCTCTGTT AGGAGTTTTT GTCAAGATG 540
 AAGAAAGAAC TTTTGTGAC GGTAGAGCTC GCACTATGCT TTTGCAITGA TGCATCTAA 600
 TGAGTTAACA TCACTCTGAT CAAAGGATA GATACCTAGA CA ATG GCT GCG AGT 664
 Met Ala Arg Ser 1

TAT GCG GAC AGA GCA AAT ACT CAT CAA TCA GCT GTG GCA GGA GGA GTG 702
 Tyr Ala Glu Arg Ala Asn Thr His Gln Ser Pro Val Ala Arg Arg Leu 5 10 15 20

TTT GCG CTT ATG GAA CAG AAA CAG AGT AAC CTA TGC GCA TCA GTC GAC 760
 Phe Ala Leu Met Glu Gln Lys Gln Ser Asn Leu Cys Ala Ser Val Asp 25 30 35

GTC AGA ACA ACT AAA GAA TTA TTC GAG CTT CTA GAT AAA TTG GGC CCA 798
 Val Arg Thr Thr Lys Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Leu Gly Pro
 40 48 80
 TTT ATC TGT TTT GGC AAC ACT CAT ATC GAC ATA ATT GAT GAC TTC AGC 846
 Phe Ile Cys Leu Ala Lys Thr His Ile Asp Ile Ile Asp Asp Phe Thr
 11 80 88
 TAT GAT GCA ACT ATT CTT GGT TTA TTG GAA CTA TCA AAG AAA CAC AAG 894
 Tyr Asp Gly Thr Ile Leu Pro Leu Leu Glu Leu Ser Lys Lys His Lys
 70 78 80
 TTT TTA ATT TTT GAG GAC AGA AAG TTT GCT GAT ATA GGC AAC ACT GTC 942
 Phe Leu Ile Phe Glu Asp Arg Lys Phe His Asp Ile Gly Asp Thr Val
 95 90 98 100
 AAG CAT CAA TAT CAA GGA GGT GTC TAC AAG ATT GCA CAA TGG GCA GAT 990
 Lys His Glu Tyr Glu Gly Val Tyr Lys Ile Ala Glu Trp Ala Asp
 108 110 118
 ATT ACA AAT GCT CAT GGT GTC ATT GGT AGT GGA ATT GTA AAG GGT CTA 1038
 Ile Thr Asn Ala His Gly Val Ile Gly Ser Gly Ile Val Lys Gly Leu
 120 128 130
 AAG GAG GCA GGC ACT GAG ACA ACA CAT CAA CCA AGC GCA CTA TTG ATG 1086
 Lys Glu Ala His Thr Glu Thr Thr Asp Glu Pro Arg Gly Leu Leu Met
 138 140 148
 TTC GCT GAA CTC TCG TCA AAG GGA TCA ATT GGC CAT GGT AAG TAC ACC 1134
 Leu Ala Glu Leu Ser Ser Lys Gly Ser Ile Ala His Gly Lys Tyr Thr
 150 158 160
 GAA GAA ACT GTA GAA ATT GCA AAA TCA GAC AAG GAA TTC GTC ATT GGC 1182
 Glu Glu Thr Val Glu Ile Ala Lys Ser Asp Lys Glu Phe Val Ile Gly
 185 170 178 180
 TTT ATT GCT CAA AAT TCT ATG GGA GGA CAA GAT GAA GGG TTC GAT TGG 1230
 Phe Ile Ala Glu Asn Ser Met Gly Gly Glu Asp Glu Gly Phe Asp Trp
 188 190 198
 ATT ATT ATC ACA CCA GGT GTT GGT TTG GAT GAC ACT GGT GAT GCT CTA 1278
 Ile Ile Met Thr Pro Gly Val Gly Leu Asp Asp Thr Gly Asp Ala Leu
 200 208 210
 GGC CAA CAA TAT CCA ACA GTC AGT CAA GTA TTT TCC ACT GGC ACT GAC 1326
 Gly Glu Glu Tyr Arg Thr Val Ser Glu Val Phe Ser Thr Gly Thr Asp
 218 220 228
 ATC ATA ATC GTA GGT GGT GGT TTG TTT GGC AAG GGC AGR GAT CCC TTA 1374
 Ile Ile Val Val Gly Arg Gly Lys Phe Gly Lys Gly Arg Asp Pro Leu
 230 238 240
 AAA GAA GGT GAA GGC TAT AGA AAA GCT GGC TGG GAA GCT TAC CAA AAT 1422
 Lys Glu Gly Glu Arg Tyr Arg Lys Ala Gly Trp Glu His Tyr Glu Asn
 248 250 258 260
 ATT CTG AGC TAAATTACAA GTATGTACAG GCGATCAATT GTTTCCGGCC 1471
 Ile Leu Arg

ATTGAAGTGA ATCGATCTTC AATTTCATCO CTCAATTTT GACCCATAT TTCAAGACC 1521
 AGAAGCCGCA CCGATCTTCC TGGAAATGTA GTTAAGCCAT TCCTAACGAA CCGTTATATA 1592
 AACCCAGCGG TCCAGATAG TTACACTTC TCATGTAGC TCACCAACTG GTGGAATGTA 1693
 TCTAAGTATG ATCGGTAAFA TAGACGGAAT TTACTTTTCT TATCCGAGGA GTTCTGTGTTG 1711
 AAATATCCCA ACGCTTCCAA GCTTCTGAAA TGTATGACT GAAGTTTGA AAATGGGTAT 1771
 TGAAGGCTTA GTACCAACAA TCCAGCCCTA GCACCAAGCA AAAGAATAAA AGTGTGCTC 1821
 AGCATATTT CACTTTTCCT TTACACTGTC TCACCTGGG GCTTCCAG AGAGCTATTT 1891
 TTGATCTTAT CAATCTCTC CATAGCTTTC TCGGTATCC TGTACCTCT ATCTTAATG 1951
 GCTTCGAATG TTGTGAATA TATAGCAAGG GATGTGCTT GTTGACCACT ACTCAAGAG 2011
 TACCCAGCAA ATACCCGCGA AAAACCACTA GTTTTATGTT TATCAAGACC GTAAATGAT 2071
 AAGTTGTAT TCTTCCGCCC AATAATCTCG GAGGCTTAG ATCCGCGATA TATTGATCA 2131
 ATTGGGCGAG CTACCAATGA CTGCGCACT CCAGCTAGAA ACCGAGCTCG AAATACATCC 2191
 ACTACTCTTG GATTGCTAT GATGTGCCC TCTTGACCT CAGTATATGA CTGCAACAP 2251
 GATAATAGC TTGTATAAG TACAATTCCT ATCAGCAAT TCGCTACCAA TCGTGGCAGG 2311
 ACGTTTGTG GTATCAACTC CCAACCATCG GTTTGACGG CTGCTAGAAA TAGAGCTGGA 2372
 TTTGAGTGA AATGGGCTG TAAGTTTAC GTTTCAAATG AGCTCCAAAG AAGATGCTTA 2431
 TTGCTGCTAT GTAGTCAAAA CCAATGGGAC GAAGCACTTT GCTGTGCTC CTGAGCTAGA 2491
 GTGAACTAAA TTGAGTACA ACAGCTCTGA TCCGAGCTGT CAGAGGAGAC ACCACTTGA 2551
 GTTTTCTTT GCTAAGAGTA GCGTTTTCG ATGCAATGTT GTTTCCTATA GTTTCTGGA 2611
 ACACAATGCC AGAATTCATA GAGGATCAGA GCGCAATGCA GCTGTGCTA TATGTATTA 2671
 TAGCGCTACC GAGCTCG 2688

配列番号 4:

(1) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 263 アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直線状

(E) 配列の種類: タンパク質

(H) 配列: 配列番号 4:

Met Ala Arg Ser Tyr Ala Glu Arg Ala Asn Thr His Glu Ser Pro Val
 1 5 10 15
 Ala Arg Arg Leu Phe Ala Leu Met Glu Glu Lys Glu Ser Asn Leu Cys
 20 25 30
 Ala Ser Val Asp Val Arg Thr Thr Lys Glu Leu Glu Leu Leu Asp
 35 40 45
 Lys Leu Gly Pro Phe Ile Cys Leu Ala Lys Thr His Ile Asp Ile Ile
 50 55 60
 Asp Asp Phe Thr Tyr Asp Gly Thr Ile Leu Pro Leu Leu Glu Leu Ser
 65 70 75 80
 Lys Lys His Lys Phe Leu Ile Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ala Asp Ile
 85 90 95
 Gly Asn Thr Val Lys His Glu Tyr Glu Gly Val Tyr Lys Ile Ala
 100 105 110
 Glu Trp Ala Asp Ile Thr Asn Ala His Gly Val Ile Gly Ser Gly Ile
 115 120 125
 Val Lys Gly Leu Lys Glu Ala Ala Thr Thr Thr Asp Glu Pro Arg
 130 135 140
 Gly Leu Leu Met Leu Ala Glu Leu Ser Ser Lys Gly Ser Ile Ala His
 145 150 155 160
 Gly Lys Tyr Thr Glu Glu Thr Val Glu Ile Ala Lys Ser Asp Lys Glu
 165 170 175
 Phe Val Ile Gly Phe Ile Ala Glu Asn Ser Met Gly Gly Glu Asp Glu
 180 185 190
 Gly Phe Asp Trp Ile Ile Met Thr Pro Gly Val Gly Leu Asp Asp Thr
 195 200 205

Gly Asp Ala Leu Gly Glu Glu Tyr Arg Thr Val Ser Glu Val Phe Ser
 210 215 220 225 230
 Thr Gly Thr Asp Ile Ile Ile Val Gly Arg Gly Leu Phe Gly Lys Gly
 235 240 245 250
 Arg Asp Pro Leu Lys Glu Gly Glu Arg Tyr Arg Lys Ala Gly Trp Glu
 255 260 265 270
 Ala Tyr Glu Asn Ile Leu Arg
 275

配列番号5:

(i) 配列の特徴:

- (A) 配列の長さ: 555塩基対
 (B) 配列の型: 核膜
 (C) 鎖の数: 不明
 (D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: cDNA

(iii) 特徴:

- (A) 特徴を表す記号: CDS
 (B) 存在位置: 3..554

(iv) 特徴:

- (A) 特徴を表す記号: 成熟ペプチド
 (B) 存在位置: 3..554

(v) 配列: 配列番号5:

GA ATT CTG CAG GGA AAC GGC CAG GGT ACA CAT TGT GGT GGT ACC ATT 47
 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555

AAC AAC AAA TTT AAG GGC TCT ACC GCT AAC ATG TCA CTG GGT GGT GGT 239
 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555

配列番号6:

(i) 配列の特徴:

- (A) 配列の長さ: 184アミノ酸
 (B) 配列の型: アミノ酸
 (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(iii) 配列: 配列番号6:

116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555

注: (内容に変更なし)

図1-1 (連続)マッププロット: P80P4配列 (1~2032)

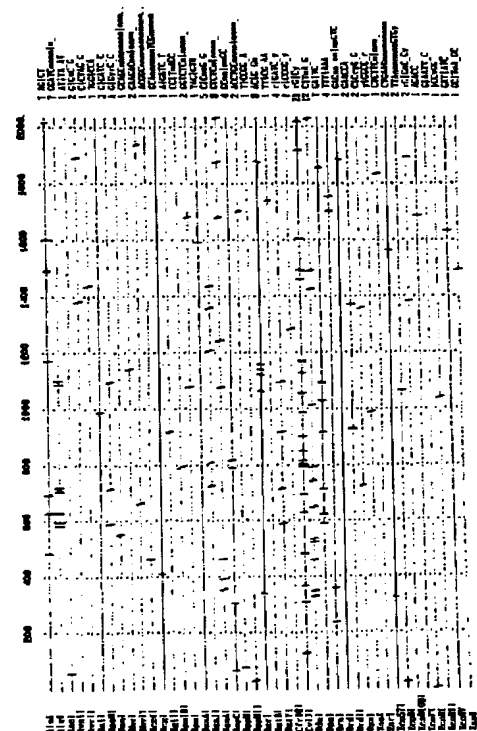


図1-2 (連続)マッピングロット: PEP4配列 (1~2032)

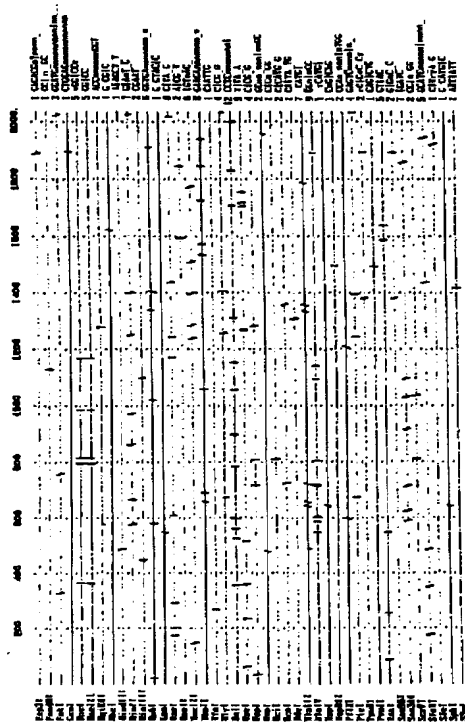


図1-3 (連続)マッピングロット: PEP4配列 (1~2032)



連続マッピングロット: PEP4配列 (1~2032)

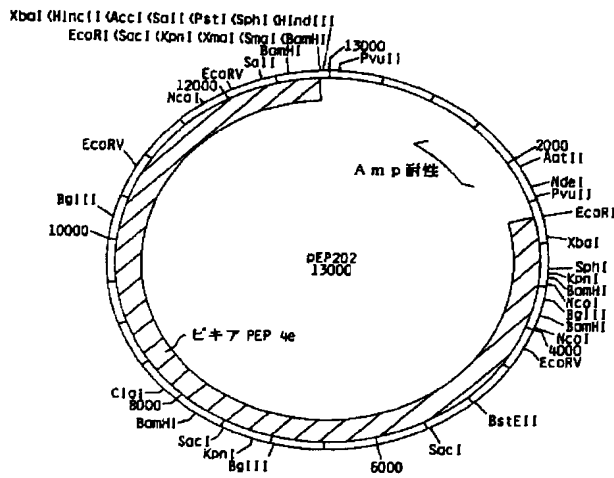


図2

図3 PEP205の連続マッピングロット



— pUC19
 ▨ PEP4 配列
 250 bp

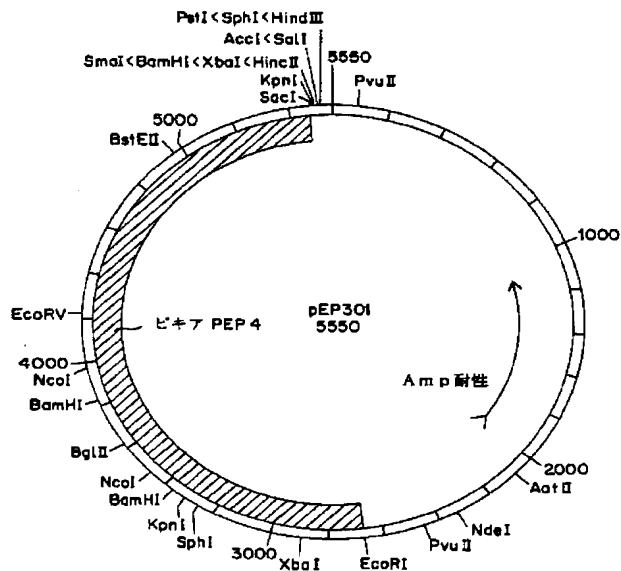


図 4

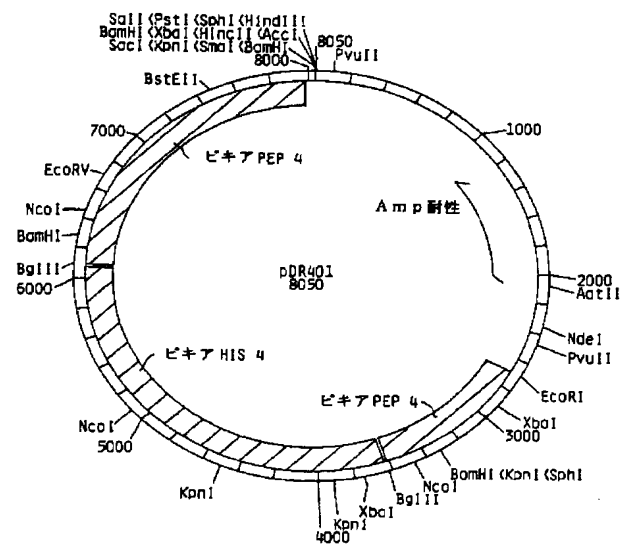


図 5

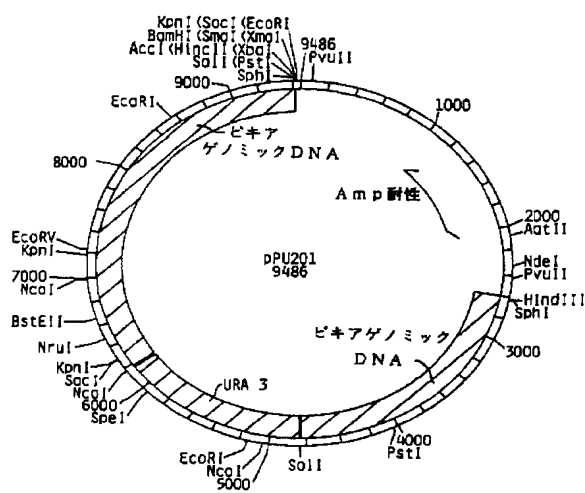
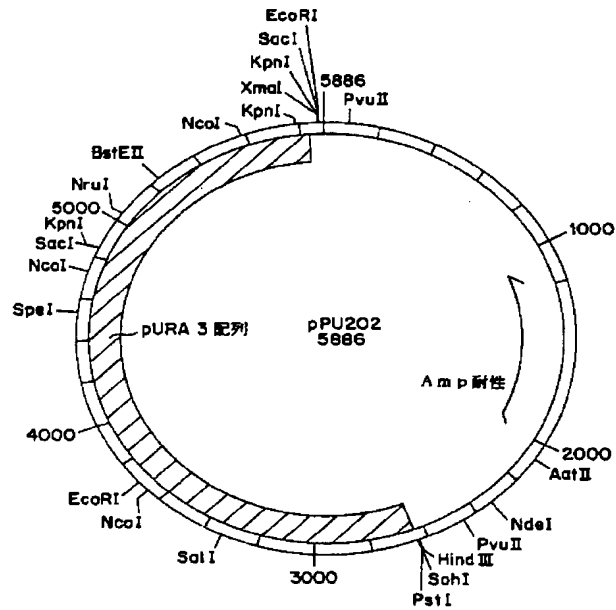


図 6



プラスミド地図: pPU202 配列: 1~5886

図 7

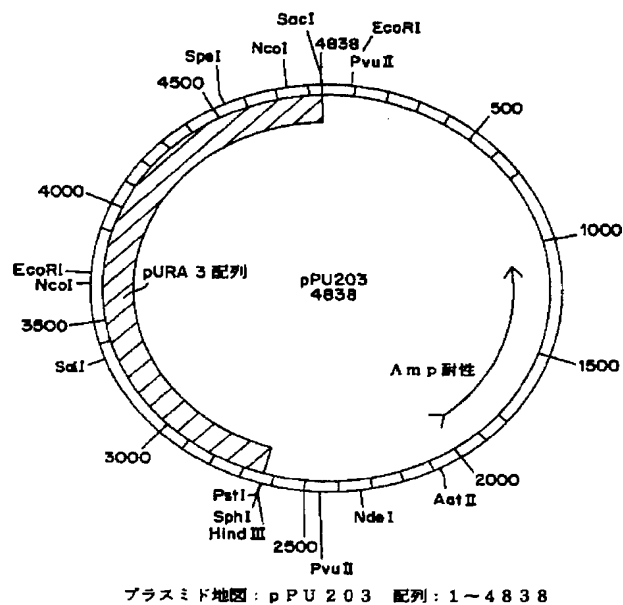


図 8

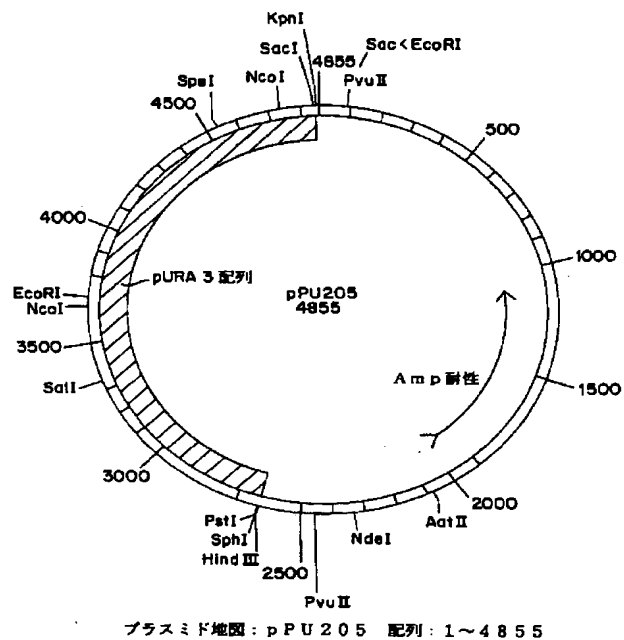


図 9

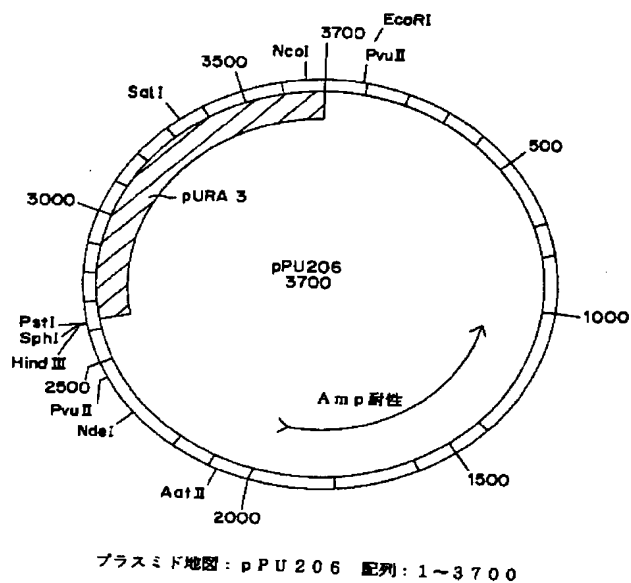


図 10

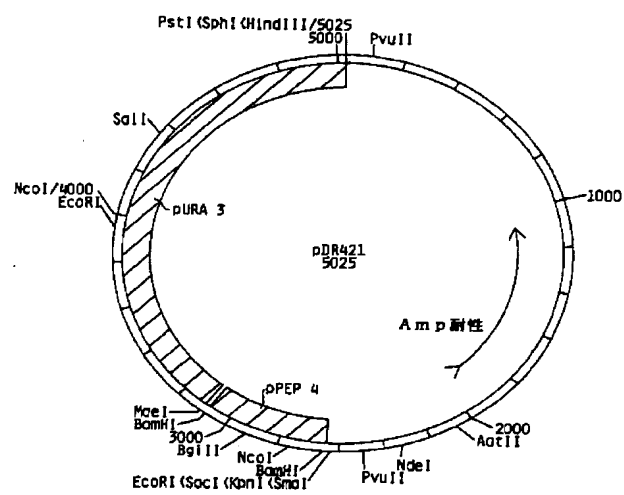


図12-1 (直線)マッププロット: Pp-Ur 3配列 (1~2688)

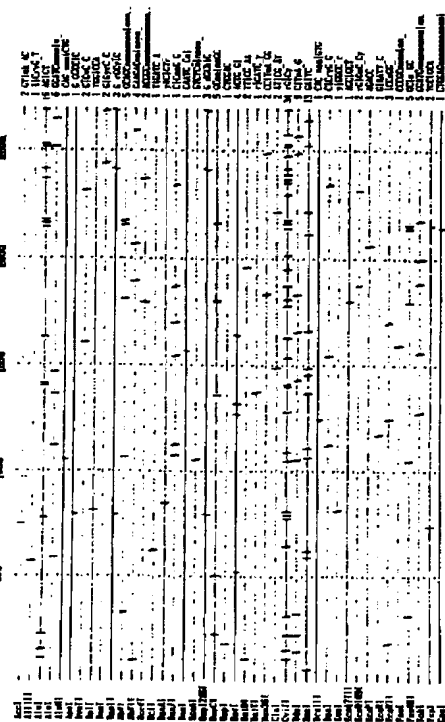


図12-2 (直線)マツプロット: $Pp \sim Ura3$ 配列(1~2688)

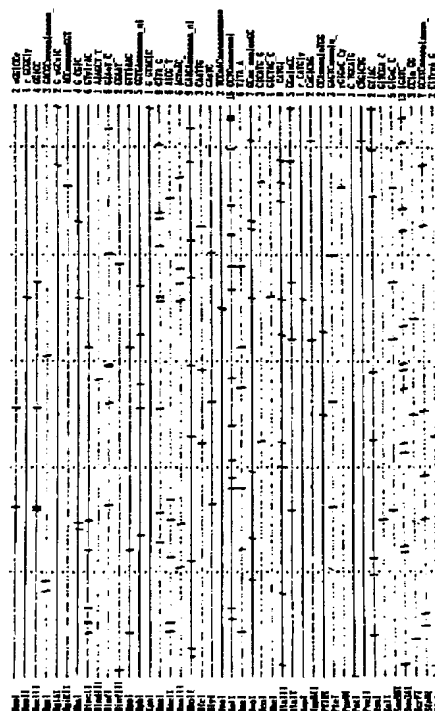


図12-3 (直線)マツプロット: Pp-Ura3配列(1-2688)

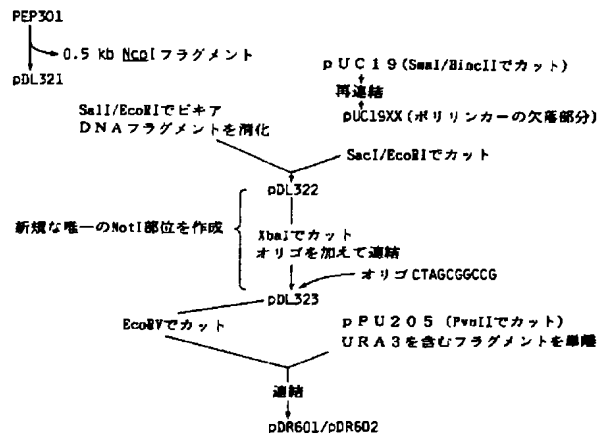
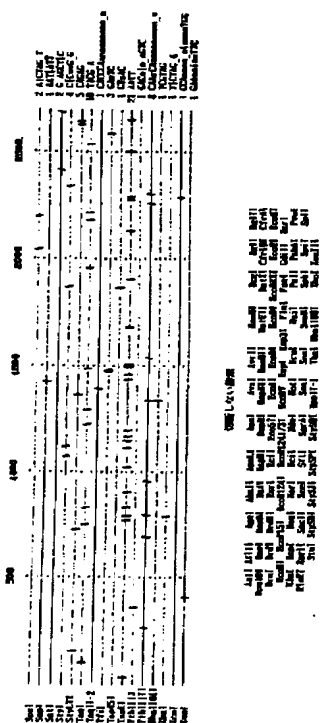


图 13

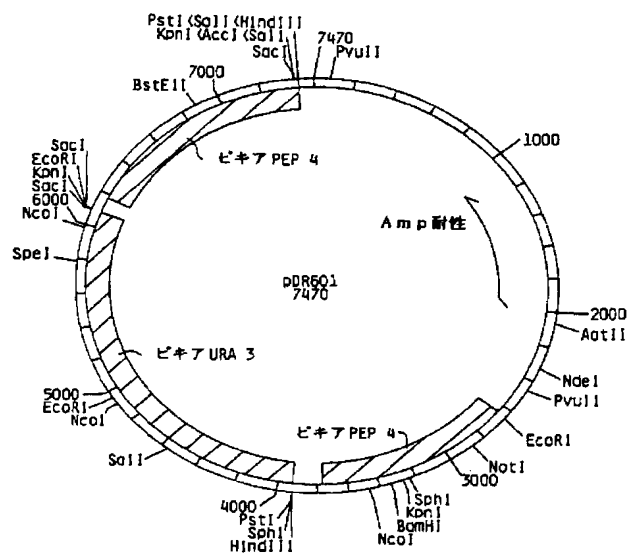


図 1 4

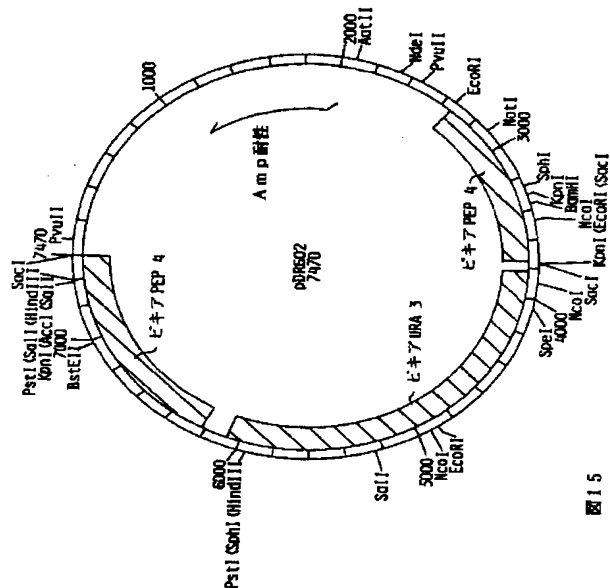


図 1 5

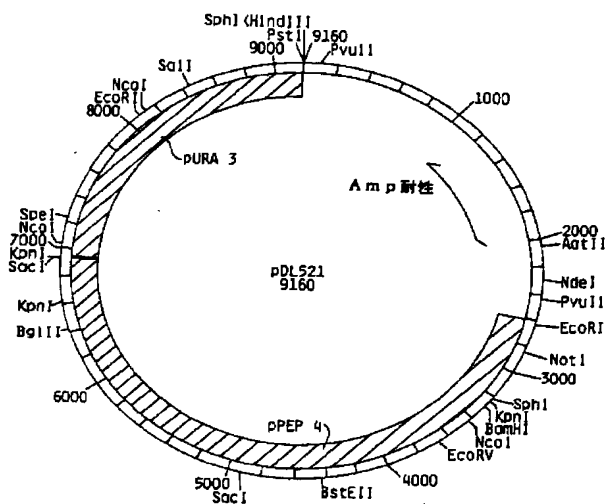


図 1 6

図 1 7-1 (連続) マッププロット: Pp-Prb1 配列 (1~555)

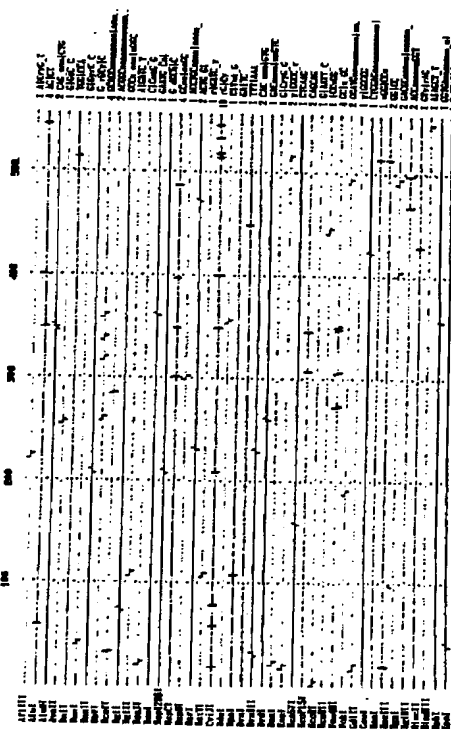


図17-2 (連続)アプゾット:Pp-Prb1配列(1~555)

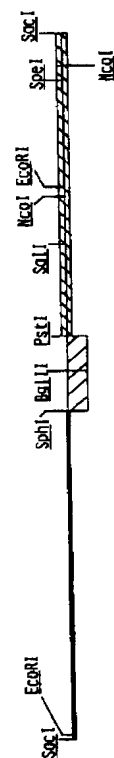
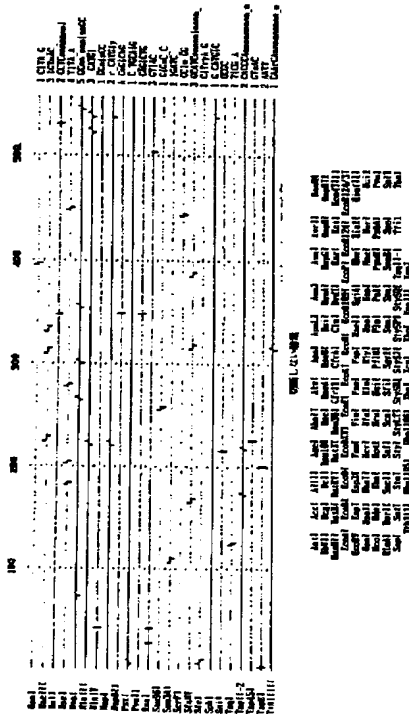


図18

PRB-1 遺伝子配列
PRB-2 遺伝子配列
— PpC19

補正書の翻訳文提出書
(特許法第184条の8)

平成 5年 9月14日

特許庁長官 麻生 渡 殿

1. 特許出願の表示

PCT/US92/02521

2. 発明の名称

ピキア (*Pichia*) 蛋白質分解活性に影響する遺伝子およびその使用

3. 特許出願人

住 所 アメリカ合衆国カリフォルニア州92037, ラ・ホーラ,
コースト・ブルヴァード・サウス 505
名 称 ザ・ソーク・インスティテュート・バイオテクノロジー/
インダストリアル・アソシエイツ・インコーポレーテッド

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手町ビル 206区
電 話 3270-6641~8646
氏 名 (2770) 弁理士 湯 浅 恭 三

5. 補正書の提出日

平成 4年12月15日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の翻訳文

1通



34条補正書の翻訳文

明 細 書

ピキア (*Pichia*) 蛋白質分解活性に影響する遺伝子およびその使用

技術分野

本発明は組換えDNA技術に関する。一つの特定の態様において、本発明は組換え技術を用いて産生される酵母株および蛋白質分解プロセッシングに含まれている蛋白質、ならびに独立栄養性マーカー蛋白質をコードしているDNAに関する。別の態様において、本発明は組換え産物、特に蛋白質分解されやすい組換え産物を産生する方法に関する。

従来技術

ピキア (*Pichia*) 属の株は組換え産物の生産のための有効な発現系として開発されてきた。しかしながら、望ましくないことに組換え法により希望通り産生されたいくつかの蛋白質産物 (例えば、IGF-1, EGF, GRFなど) は宿主生物により産生されるプロテアーゼにより分解されやすい。そのような場合、高レベルの所望の生成物が発現されても、ある種の宿主株の蛋白質分解酵素の存在による生成物の分解により生成物の回収率の減少がしばしば起こる。生成物の回収は種々の蛋白質分解産物の存在のためさらに複雑である。

多くの組換え産物の生産のためにピキア (*Pichia*) に基づく発現系を良好に作動させるためにはピキア (*Pichia*) のある種の蛋白質分解活性を減少または除去することが望まれるであろう。これにより、組換えピキア (*Pichia*) 宿主中でのプロテアーゼ感受性産物の分解の可能性が減少するであろう。分解の可能性の減少によりそのような産物を實質的に無害の形で発現および回収する能力が促進されるであろう。

組換え体により産生される生成物の蛋白質分解の問題を減少または除去させるために種々の技術が応用できる。例えば、プロテアーゼ活性が阻害されるように組換え体株が増殖する条件を修正することができる。例えばこのことは種々のプ

ロテアーゼ作用を阻害するのに十分なように培地の pH を調節することにより達成される。しかしながら、この方法はある種の組織発生物を発現する宿主生物の能力に（ならびに発現するやいなや、得られた生成物の安定度にも）影響を与えるであろう。さらに、この方法は細胞外蛋白質分解に対する効果のみに制限される。

また、組織発生物により生産された蛋白質分解に敏感な生成物を分解する蛋白質分解活性に関する宿主生物のプロセッシング酵素のいくつかまたは全部を修飾または除去しようとする試みがある。しかしながら、真核生物における蛋白質分解過程は非常に複雑であり連係が保たれている。従って、蛋白質分解プロセッシング経路に含まれている 1 つまたはそれ以上の酵素の除去および/または修飾が宿主の生存度、および/または組織発生物により生産された生成物の安定度に対して影響を及ぼすかどうかを予測するのは不可能である。

酵母 サッカロマイセス セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) のいくつかの蛋白質分解活性が特徴付けられている。例えば、プロテイナーゼ A は S. セレビジエ (*cerevisiae*) PEP4 遺伝子によりコードされている。プロテイナーゼ A は液性アスパルテリ プロテアーゼであり、自己活性化ならびにカルボキシペプチダーゼ Y およびプロテイナーゼ B のような別の液性プロテアーゼを活性化する。カルボキシペプチダーゼ Y はこの酵素のプロテイナーゼ A 媒介蛋白質分解プロセッシング前では完全に不活性であるらしいが、プロテイナーゼ B (S. セレビジエ (*cerevisiae*) の PRB-1 遺伝子によりコードされている) はその前駆体形（酵素がプロテイナーゼ媒介プロセッシングを受ける前に存在する形）で約 50% 生物的に活性であると報告されている。

蛋白質分解活性を欠く S. セレビジエ (*cerevisiae*) および糸状菌が異種ペプチドの組織発生物に使用されてきた。しかしながら、これらの生物はメチロトロフ酵母 ピキア (*Pichia*) とは本質的に異なっている。サッカロマイセス (*Saccharomyces*)、アスペルギルス (*Aspergillus*) および ピキア (*Pichia*) 間には多くの代謝的および生理的相違が存在するため、これらの種々の生物の蛋白質分解プロセッシング系は同じである

別の実施態様に従うと、ピキア (*Pichia*) オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ蛋白質 (URA3 遺伝子) をコードしている遺伝子が提供される。この遺伝子の有効性は、ピキア (*Pichia*) の株 (Ura⁻) と組合せて、蛋白質分解活性が欠損した ピキア (*Pichia*) の組織発生物の産生に使用するための選択系が提供されることである。そのような Ura⁻ 株はまた、種々の異種生成物の組織発生物に使用される組織発生物 DNA 作製物による形質転換の宿主としても有用である。

図面の簡単な説明

図 1 はプラスミド pEP202 の制限地図である。
図 2 はプラスミド pEP205 の制限地図である。
図 3 はプラスミド pEP301 の制限地図である。
図 4 はプラスミド pDR401 の制限地図である。
図 5 はプラスミド pPU201 の制限地図である。
図 6 はプラスミド pPU202 の制限地図である。
図 7 はプラスミド pPU203 の制限地図である。
図 8 はプラスミド pPU205 の制限地図である。
図 9 はプラスミド pPU206 の制限地図である。
図 10 はプラスミド pDR421 の制限地図である。
図 11 は pDR601 および pDR602 の作製に使用された工程を要約している。

図 12 はプラスミド pDR601 の制限地図である。
図 13 はプラスミド pDR602 の制限地図である。
図 14 はプラスミド pDL521 の制限地図である。
図 15 はプラスミド pDR911 の制限地図である。

発明の詳細な説明

本発明に従うと、ピキア (*Pichia*) 属の株の蛋白質分解活性に直接的にまたは間接的に影響する蛋白質をコードしている遺伝子を含む前記の株から得られた単離 DNA 断片が提供される。

本発明の別の実施態様に従うと、修飾されていない同じ種の宿主株と比較して

必要はない。実際、ピキア (*Pichia*) 内に存在する蛋白質分解活性の型に関しては現在ほとんど知られていない。

さらに、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) または アスペルギルス (*Aspergillus*) と異なり、異種ペプチドの組織発生物に使用される ピキア (*Pichia*) 細胞は、典型的には高細胞密度で増殖され、それは少くとも一部には発酵過程の間の発泡を最少にする株を選択することにより可能である。そのような細胞の選択は培地内へ分泌される蛋白質の大きさを減少させて発泡をおさえる多量のエンドおよびエキソプロテアーゼを産生する細胞を選択することにより達成される。さらに、高細胞密度での増殖で異種ペプチドが高収率で得られるが、一方高細胞密度での増殖は発酵培地中に比較的高レベルの液性プロテアーゼを供給する。典型的には ~1% の細胞が酵母発酵の間に溶菌するので、高細胞密度は培地内へかなりの量の細胞物質（液性プロテアーゼを含む）の放出を伴う。従って、高細胞密度法における異種ペプチドの産生の間に、ピキア (*Pichia*) により産生され、分泌されたいくつかの異種ペプチドは実質的な蛋白質分解をうける。

従って、ピキア (*Pichia*) のプロテアーゼ欠失株を提供することおよびそのような株を発生させる手段を提供するのが本発明の目的である。異種蛋白質の発現のためのプロテアーゼ欠失株の使用もまた本発明の目的である。

発明の概要

本発明に従うと、ピキア (*Pichia*) 属の種の蛋白質分解過程に含まれている遺伝子が単離され、特徴付けされた。そのような遺伝子の有効性とは、蛋白質分解感受性生成物の発現のための宿主として有用である蛋白質分解活性が欠失した ピキア (*Pichia*) の株を発生させる手段を提供することである。

野生型 ピキア (*Pichia*) 細胞と比較して、蛋白質分解活性が欠失させるために修飾された ピキア (*Pichia*) の株は、蛋白質分解感受性生成物をコードしている組織発生物の発現のための優れた宿主である。本発明で提供されるプロテアーゼ欠失宿主細胞中の低レベルの蛋白質分解活性と結合された ピキア (*Pichia*) 発現系を用いる高レベルの組織発生物発現の利点は、蛋白質分解感受性生成物の産生のための非常に有効な発現系を提供することである。

蛋白質分解活性が欠失している ピキア (*Pichia*) 属の修飾株を作り出す方法が提供される。その方法は：

前記宿主株を上記遺伝子の修飾型（前記修飾はその遺伝子を機能的生成物が産生できないようにするか、または蛋白質分解活性に影響する遺伝子生成物の能力を変化させる）と接触させる（ここで前記の接触は前記宿主株のゲノム内への上記遺伝子の上記修飾型の部位特異的組込みに適した条件下で実施され、前記部位特異的組込みは、蛋白質分解活性に影響する前記蛋白質をコードしている前記遺伝子の特定の座位で起こる）ことを含んでいる。

本発明のさらに別の実施態様に従うと、蛋白質分解活性が欠失した ピキア (*Pichia*) 属の株が提供される。そのような株は色々な方法で産生できるが、現在そのような株を産生する良好な方法は上記の方法である。

本発明のさらに別の実施態様に従うと、蛋白質分解感受性組織発生物の発現方法が提供され、前記方法は、前記蛋白質分解感受性生成物を蛋白質分解活性が欠失している上記 ピキア (*Pichia*) 細胞中で発現させることを含んでいる。

本発明のさらに別の実施態様に従うと、オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子を含む ピキア (*Pichia*) 菌株から得られた単離 DNA 断片が提供される。

本発明のさらに別の実施態様に従うと、組織発生物 DNA 作製物を形質転換できる宿主としての ピキア (*Pichia*) 属の酵母細胞が提供される（前記宿主はオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子が欠失している）。

本明細書で使用する用語「蛋白質分解活性」とは、蛋白質分解経路に含まれる酵素により示される 1 つまたはそれ以上の酵素活性を表わしている。蛋白質分解活性には、プロテイナーゼ A 活性、プロテイナーゼ B 活性、カルボキシペプチダーゼ Y 活性、カルボキシペプチダーゼ S 活性、アミノペプチダーゼ C 活性、ジペプチルアミノペプチダーゼ活性、プロテイナーゼ D 活性、プロテイナーゼ E 活性などが含まれる。

本明細書で使用される場合、直接または間接的に酵母株の蛋白質分解活性に影響する蛋白質をコードしている遺伝子には、プロテイナーゼをコードしている遺伝子またはプロテイナーゼに作用する蛋白質をコードしている遺伝子が含まれる。

ここに使用される場合、蛋白質に作用する蛋白質とは、プロテイナーゼの活性を変化させるかまたは調節する蛋白質を表わしている。従って、例えば蛋白質分解活性に直接影響する蛋白質とはプロテイナーゼをコードしている蛋白質であり、蛋白質分解活性に間接的に影響する蛋白質とは蛋白質分解プロセッシングにより蛋白質を活性化するまたは活性を増加させる蛋白質である。サッカロマイセス セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) プロテイナーゼはサッカロマイセス セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の蛋白質分解活性に直接および間接的に影響を与える蛋白質の例である。

本発明の一つの実施態様に従うと、直接または間接的にピキア (*Pichia*) 属の株のカルボキシペプチダーゼY活性に少くとも影響を及ぼす蛋白質をコードしているピキア (*Pichia*) 遺伝子がピキア (*Pichia*) 属の一つの種から単離され同定された。この遺伝子は以後便宜上、この遺伝子およびS. セレビジエ (*cerevisiae*) PEP4遺伝子の間のいくつかの類似性存在に基づき、ピキア (*Pichia*) PEP4遺伝子と称される。しかしながら、ピキア (*Pichia*) 遺伝子およびサッカロマイセス (*Saccharomyces*) 遺伝子のヌクレオチド配列は本質的には異なっていることを認識された。この遺伝子をコードしている配列を含む断片は種々の材料から簡単な操作により容易に得ることができる。そのような材料の一つはプラスミド PEP202 (図1参照) の約10.6Kbp EcoRI断片であり、もしくはプラスミド PEP301 (図3参照) の約2.7Kbp EcoRI-SacI断片である。

プロテイナーゼA遺伝子をコードしているDNAもまた提供される。本発明のプロテイナーゼA遺伝子は配列番号2に示したアミノ酸配列を参照することによりさらに特徴付けできる。配列番号2に示されたものと本質的に同一のアミノ酸配列をコードしている任意の核酸配列を持つDNA、または相同的遺伝子の破壊のために有用であるような十分な相関性を持つDNAも本発明の実施に使用できる。上記のアミノ酸配列をコードしている核酸の例は配列番号1に示されている。

ピキア (*Pichia*) 属の株の蛋白質分解活性に直接または間接的に影響を及ぼす蛋白質をコードしているピキア (*Pichia*) 遺伝子は、遺伝子の機能

的生成物を産生できないようにするため、または前記ピキア (*Pichia*) 株の蛋白質分解活性に影響を及ぼす遺伝子産物の能力を変化させるために種々の方法により修飾できる。当業者は上記遺伝子の修飾のために多くの方法があることを認めるであろう。例えば、遺伝子によりコードされている蛋白質のアミノ酸配列を修飾するためにコード配列に突然変異を起こすことができる。もしくは、コード配列の種々の部分を遺伝子から欠失させることができる。欠失は発現された生成物を非機能的にするだけで十分である (たとえまだそれが発現できていても)。従って、たった一つのヌクレオチドが欠失されても、強いのコード配列を読み解くからは必ずしもことにより、たとえ発現できていても生成物の機能を失わせることができる。もちろん、より大きな欠失は本質的に修飾された生成物を発現するようになり、およびそのような生成物は、無害の遺伝子により産生される生成物と比較して非常に異なった蛋白質分解性を持っているであろう (もしあったとしても)。さらに別の方法としては、問題とする遺伝子の読み解を破壊するようにコード配列内へ追加の配列を挿入でき、それにより、発現される生成物は劇的に変化され、または完全に発現されなくなるであろう。

ピキア (*Pichia*) 属の株の蛋白質分解活性に直接または間接的に影響を及ぼす蛋白質をコードしているピキア (*Pichia*) 遺伝子の修飾に特に都合の良い方法は前記ピキア (*Pichia*) 遺伝子内へ独立栄養性のマーカー遺伝子を挿入し、それによりピキア (*Pichia*) 遺伝子を破壊することである。そのような独立栄養性マーカー遺伝子はピキア (*Pichia*) またはサッカロマイセス (*Saccharomyces*) HIS4遺伝子、ピキア (*Pichia*) またはサッカロマイセス (*Saccharomyces*) ARG4遺伝子、ピキア (*Pichia*) またはサッカロマイセス (*Saccharomyces*) URA3遺伝子などから選択できる。

蛋白質分解活性を欠くピキア (*Pichia*) 株は種々の方法により調整できる。現在のところ好適な方法は、選した宿主中、本発明の遺伝子 (この遺伝子は修飾されていない形ではピキア (*Pichia*) 属の株の蛋白質分解活性に、直接または間接的に影響を及ぼす蛋白質をコードしている) を修飾することから成る。もしくは、宿主株に無作為的な (即ち非選択的) 突然変異を起こさせ、蛋白

質分解活性を欠く突然変異体を選択するためにスクリーニングを行う。

宿主中、本発明の遺伝子を修飾させることにより蛋白質分解活性欠失株が産生される場合、そのような修飾は例えば、蛋白質分解活性に影響する蛋白質をコードしている遺伝子 (即ち標的遺伝子) の特定の座位での宿主のゲノム内の修飾遺伝子の部位特異的組込みに適した形質転換条件下で修飾遺伝子を導入することにより実施される。組込みは宿主の内在性遺伝子を置き換えまたは修飾するであろう。酵母宿主の標的座位内への修飾遺伝子の導入に都合の良い方法は宿主内の天然の遺伝子の2つの別々の相同的な末端を持つ直鎖状DNA断片中に修飾遺伝子を包含させることである。こうすれば形質転換により、その発現生成物が蛋白質分解活性に影響を与える遺伝子の特定の部位で相同的組換えを起こすように方向付けられるであろう。

蛋白質分解活性を欠くピキア (*Pichia*) 株は上に記したような (即ち、その発現生成物が蛋白質分解活性に影響する遺伝子の特定の座位での部位特異的組込みにより、本発明の修飾遺伝子を通した宿主内へ導入し、それにより、すべてまたは一部の修飾遺伝子で内在性遺伝子のすべてまたは一部を置き換える) 好適な方法で調整され、内在性遺伝子は破壊されているであろう。

ここで使用される場合、術語遺伝子“破壊”とは機能性生成物が生じないか、または変化した機能を持つ生成物を得るように遺伝子を最終的に生じさせる標的座位の操作を意味している。従って、付加された配列の存在 (例えば独立栄養性マーカーの導入または読み解のシフトを起こす配列の導入により)、標的遺伝子からのヌクレオチドの消失 (例えば欠失により)、または標的遺伝子の他の突然変異により破壊をおこすことができる。蛋白質分解活性を欠くピキア (*Pichia*) 株を調製する好適な方法では遺伝子付加、遺伝子置換またはここで“ポップイン-ポップアウト”と称される付加および置換の組合わせにより遺伝子破壊が達成される。遺伝子置換においては内在性標的遺伝子が標的座位から物理的に除去され、修飾遺伝子と置換される。このことは、標的遺伝子の5'および3'の各々の末端と相同的な末端を持つ直鎖状断片で宿主を形質転換することにより達成される。遺伝子付加では内在性標的遺伝子へ形質転換DNAが付加される。形質転換DNAの修飾遺伝子が置換される方法に依存して、遺伝子付加によ

り標的遺伝子の二つの非機能的コピーまたは標的遺伝子の一つの機能的および一つの非機能的コピーが生じる可能性がある。二つのコピーの各々が内在性遺伝子の一部および形質転換DNAの一部から成り立っている。もし、遺伝子付加後に標的遺伝子の一つの機能的コピーが残っていたら、残っている標的遺伝子の二つのコピー間による相同的組換えによりそれを除去することができる。相同的組換えへと続く遺伝子付加の組合せ過程はポップイン-ポップアウト過程である。

ピキア (*Pichia*) 属の酵母を形質転換する方法ならびにそのような酵母細胞の培養に適用できる方法は本分野では一般的なものである。上記の修飾遺伝子を含む構成物は、Cregg et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5: 3376 (1985) および米国特許第4,879,231号により記載されているスフェロプラスト技術またはピキア (*Pichia*) に適応させるために修正された [欧州特許出願第312,934号参照: 米国特許第4,929,535号も利用できる] 全細胞強化リチウム酵母形質転換系 [Ito et al., *Agric. Biol. Chem.*, 48: 341 (1984)] によりピキア (*Pichia*) 細胞を形質転換する。スフェロプラストの発生および維持を必要としないので、しばしば全細胞強化リチウム法が便利である。スフェロプラスト法は一般的に形質転換の効率がより良い手段であるので、本発明の目的にはスフェロプラスト法が好適である。

上記の修飾遺伝子により形質転換される宿主ピキア (*Pichia*) 株は野生型ピキア (*Pichia*) 細胞であり、蛋白質分解経路の欠失遺伝子による形質転換により、減少した蛋白質分解活性でスクリーニングできることを当業者は認識するであろう。用いられる宿主株は所望の形質転換体の同定および選択を助けるために一つまたはそれ以上の欠損を持つことができる。

ピキア (*Pichia*) 株の蛋白質分解活性に直接または間接的に影響する蛋白質をコードしている遺伝子の修飾形での形質転換に使用される好適な宿主は、少くとも一つの独立栄養性マーカー遺伝子が欠失した株である。そのような宿主を本発明の修飾形および独立栄養性マーカー遺伝子で同時形質転換することにより形質転換DNAが取り込まれた (従って宿主の蛋白質分解活性に直接または間接的に影響する蛋白質をコードしている遺伝子の破壊形を持っているはずである)

株の迅速な選択が可能になるため、前記の宿主生物の使用が好適である。

本発明の実施に有用な独立栄養性マーカー遺伝子の例としては（即ち、使用される好適な宿主株に欠損しているマーカー遺伝子）ヒスチジノール デヒドロゲナーゼ遺伝子、アルギニノスクシネート リアーゼ遺伝子、またはオロチシン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子などが挙げられる。そのような宿主株がピキア (*Pichia*) の形質転換に用いられた場合、上記の修飾遺伝子（直鎖状DNA断片に含まれている）は、好適には宿主株が欠失している独立栄養性マーカー遺伝子の無傷の形と会合する（例えば独立栄養性マーカー遺伝子の各々は修飾遺伝子内に含まれているかまたは形質転換用直鎖状DNA断片上の修飾遺伝子の5' または3' に位置している）。本発明の実施での使用が企図されている宿主株の例としては、HIS-4欠失ピキア (*Pichia*) 株、GS115 (ATCC 20884)、ARG-4欠失ピキア (*Pichia*) 株、GS190、HIS-4/URA3欠失ピキア (*Pichia*) 株、GS4-2、HIS4/ARG4欠失ピキア (*Pichia*) 株PPF1 (NRRL Y-18017; 米国特許第4, 812, 405号参照) などが挙げられる。ヒスチジノール デヒドロゲナーゼをコードしている機能性遺伝子が挿入されている上記修飾遺伝子を含むDNA断片は、例えば、プラスミドpDR401の約5, 3Kbp SacI-EcoRI断片から得ることができる。上記遺伝子の修飾形を含むDNA断片（オロチシン-5'-リン酸デカルボキシラーゼをコードしている機能性遺伝子の5' に位置している）の別の断片は、例えば、プラスミドpDR421の約5, 0 Kbp BglII断片から得ることができる。

蛋白質分解活性を欠くピキア (*Pichia*) 株の特に都合のよい応用例は、例えば表皮増殖因子 (EGF)、成長ホルモン放出因子 (GRF)、インシュリン様増殖因子-1 (IGF-1) などのような蛋白質分解感受性組織生成物の発現である。蛋白質分解活性を欠く組織生成ピキア (*Pichia*) 株で発現された場合、宿主生物の蛋白質分解能力が修飾されているため、生じる組織生成物のうける蛋白質分解活性のレベルは低い。

蛋白質分解感受性生成物産生のための蛋白質分解欠失ピキア (*Pichia*) 発現系は種々の方法により作ることができる。例えばピキア (*Pichia*) 宿

主は上記のごとく蛋白質分解欠損にでき、次にさらに問題とする異種蛋白質（特に蛋白質分解感受性蛋白質）をコードしているDNAで形質転換される。もしくは、問題とする異種蛋白質をコードしているDNAをすでに有する (bearing) 組み換えピキア (*Pichia*) 株を後から例えば上記のように蛋白質分解を欠失させるようにできる。さらに別の例では、ピキア (*Pichia*) 株は上記の修飾遺伝子および問題とする異種の蛋白質分解感受性蛋白質をコードしているDNAで同時形質転換できた。

ペプチド生成物の組織発現における宿主株としてのピキア (*Pichia*) 属の株の使用は以前に非常に詳細に記述されている。本発明の実施における使用のために實在のところ好適な酵母種は、唯一の炭素源およびエネルギー源としてメタノールを効率よく利用できる既知の工業的酵母種のピキア パストリス (*Pichia pastoris*) である。

メチロトロフ酵母には多数のメタノール応答性遺伝子があり、各々の発現はメタノール応答性制御領域（プロモーターとも称される）により制御されている。そのようなメタノール応答性プロモーターは本発明の実施における使用にも適している。特別の制御領域の例としては、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) AOX1からのプライマー アルコールオキシダーゼ遺伝子のためのプロモーター、P. パストリス (*P. pastoris*) AOX2 [P. パストリス (*P. pastoris*) は二つの機能的なアルコールオキシダーゼ遺伝子を含んでいることが知られている：アルコール オキシダーゼI (AOX1) およびアルコール オキシダーゼII (AOX2)；二つのAOX遺伝子のコード部分はDNAおよび予測されるアミノ酸配列の両方のレベルで非常に相同的であり、共通の制限部位を共有している；二つの遺伝子から発現される蛋白質は類似の酵素性質を持っているがAOX1のプロモーターはより効率的であり、その遺伝子産物はしばしばより多く発現される] からのセカンダリー アルコール オキシダーゼ遺伝子のためのプロモーター、P. パストリス (*P. pastoris*) からのジヒドロキシアセトン シンターゼ遺伝子 (DAS) のためのプロモーター、P. パストリス (*P. pastoris*) からのP40遺伝子のためのプロモーター、P. パストリス (*P. pastoris*) からのカタラーゼ遺伝子のためのプ

ロモーター、P. パストリス (*P. pastoris*) からのアルデヒド デヒドロゲナーゼ遺伝子のためのプロモーター、P. パストリス (*P. pastoris*) からの置換デヒドロゲナーゼ遺伝子のためのプロモーターなどが挙げられる。

現在のところ、P. パストリス (*P. pastoris*) 宿主において、蛋白質分解感受性生成物をコードする遺伝子の発現の制御のための好適なプロモーター領域はP. パストリス (*P. pastoris*) のメタノール制御プライマー アルコール オキシダーゼ遺伝子のプロモーターである。プロモーターを含むAOX1遺伝子は単離され、十分に特徴付けられている：Ellis et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:1111 (1985) および米国特許第4, 855, 231号参照。

組織生成蛋白質発現株の発生のためにピキア (*Pichia*) 細胞の形質転換に使用される現在好適な発現カセットは、転写の読み枠の方向に、以下のDNA配列を含んでいる：

(i) メチロトロフ酵母のメタノール応答性遺伝子のプロモーター領域；

(ii) (a) 随意的分泌シグナル配列、および

(b) 問題とする異種蛋白質

から本質的にポリペプチドをコードしているDNA配列；および

(iii) メチロトロフ酵母中の機能的な転写ターミネーター；

ここで前記DNA配列は、前記ポリペプチドをコードしている配列の転写のため機能的に作用するようにお互いに関連している。本発明の実施に使用される発現ベクターに随意に含まれている分泌シグナル配列をコードしているDNA配列には、蛋白質分解感受性生成物に関連した天然の分泌シグナル配列をコードしているDNA、S. セレビジエ (*S. cerevisiae*) α -マッファイン (α MF) リーダー配列をコードしているDNA（プロセッシング部位をコードしているDNA配列を含む、lys-arg）、およびウシ リンゾチームC シグナル配列のようなメチロトロフ酵母細胞で機能するシグナル配列を含んでいる。

本発明に使用されるメチロトロフ酵母で機能する転写ターミネーターは (a) 転写途中でポリアデニル化信号およびポリアデニル化部位を提供するサブセグメントおよび/または (b) 発現カセットで提供されるプロモーターから

の転写の転写終結信号を提供するサブセグメントを持っている。ここで使用される術語「発現カセット」とは本明細書および請求の範囲を通して、発現過程に機能的に作用する配列を含むDNA配列を意味している。金転写ターミネーターは蛋白質コード化遺伝子からとられ、それはプロモーター原の遺伝子と同じでも異なっていない。

蛋白質分解感受性生成物の組織発現のための宿主の形質転換に使用される本発明のDNA構成物中、発現カセットのセグメントはお互いに「機能するように関連して」いるであろう。蛋白質分解感受性生成物をコードしているDNA配列はプロモーター、分泌シグナル配列（もし用いられるなら）および転写ターミネーターに関して機能的に作用するように位置し配向されている。従って、プロモーター領域の制御下、ポリペプチドをコードするセグメントは、翻訳により所望のポリペプチドを提供できる転写体内へ転写される。適切な読み枠の位置決定および発現カセットの種々のセグメントの配向は当業者には周知のことである；より詳細には説明は実施例に与えられている。

本発明の実施には、蛋白質分解感受性生成物の組織発現のための宿主は、一つのDNA断片に含まれている上記発現カセットの多数のコピーで（好適には先端-末端で配向している）形質転換されるのが好適である。

さらに、本発明に従ったDNA構成物が部位特異的組み込みによる蛋白質分解感受性生成物の組織発現の宿主の形質転換に使用された場合、構成物を含む発現カセットは直鎖状DNA断片（その中のDNA断片の組み込みが有効なように宿主の所望の座位へ配向する）である。もし、導入されるべきDNAが標的遺伝子の断片座位と0. 2 kbほどの相同性しか持っていないなら、一工程遺伝子組み込みが通常有用である；しかしながら、効率を上げるには相同性の程度を最大にするのが好適である。

蛋白質分解感受性生成物の組織発現の宿主の形質転換に本発明に従って使用されるDNA構成物は随意に一つまたはそれ以上の発現カセットに加えて選択可能マーカー遺伝子をさらに含んでいる。この目的には、メチロトロフ酵母中で機能的に作用する任意の選択可能マーカー遺伝子が用いられる、即ち、メチロトロフ酵母細胞に表現型を与え、それにより大多數の非形質転換細胞の中でも同

定が可能になり、および選択的に増殖する。適した選択可能マーカー遺伝子には、例えば、独立栄養性突然変異体 *P. パストリス* (*pastoris*) 宿主株および宿主欠陥を補足する野生型合成遺伝子から組立てられた選択可能マーカー系が挙げられる。例えば、*HIS4⁺ P. パストリス* (*pastoris*) 株の形質転換に *S. セレビジエ* (*cerevisiae*) または *P. パストリス* (*pastoris*) *HIS4* 遺伝子が用いられるであろうし、*ARG4⁺* 突然変異体 *P. パストリス* (*pastoris*) 株の形質転換には *S. セレビジエ* (*cerevisiae*) *ARG4* 遺伝子または *P. パストリス* (*pastoris*) *ARG4* 遺伝子が用いられるであろうし、*URA3⁺* 突然変異体 *P. パストリス* (*pastoris*) 株の形質転換には、*S. セレビジエ* (*cerevisiae*) *URA3* 遺伝子または *P. パストリス* (*pastoris*) *URA3* 遺伝子が用いられるであろう。

さらに、本発明のこの態様に従った蛋白質分解感受性生成物の組換え発現の宿主の形質転換に使用される DNA 構成物は、随意に細菌中で機能的に作動する選択可能マーカー遺伝子をさらに含んでいる。従って、大多数の非形質転換細胞の中から同定されおよび選択的に増殖するように細菌細胞を形質転換することを可能にする細菌変型を与える任意の遺伝子が使用できる。この追加の選択可能マーカーは本発明の DNA の増幅のため大腸菌のような細菌内への形質転換を可能にする。適した選択可能マーカーにはアンピシリン耐性遺伝子 (*Amp^r*)、テトラサイクリン耐性遺伝子 (*Tc^r*) などが含まれる。

本発明の DNA が細菌細胞でも適用するように意図された場合、細菌の世代から世代へ本発明の DNA が維持されるのを確実にするため、DNA 構成物中に細菌の複製起点を包含させる事が望ましい。細菌の複製起点の例としては *lacori*、コリシン、*Col E1* などが含まれる。

ここで使用される用語「発現ベクター」には、その中に含まれている DNA 配列を発現できるベクターを含んでいるつもりであり、そのような配列はその発現が有効なように他の配列と（即ち、プロモーター配列）機能的に作動するような関係にある。一般には、組換え DNA 技術で通常使用される発現ベクターはしばしば「プラスミド」の形である（即ち、環状、二本鎖 DNA ループ、そのベク

ターは染色体に結合しない）。本明細書においては用語「ベクター」および「プラスミド」は互換的に使用されている。しかしながら、本発明には機能的に同等な他の形の発現ベクターも同様に含まれるつもりである。

ピキア (*Pichia*) 属の酵母を形質転換する方法、ならびに、そのような酵母細胞の培養に応用できる方法は一般的には本分野では既知である。

本発明に従うと、上記の発現ベクターおよび/または異種の蛋白質分解感受性生成物をコードしている発現カセットを含む構成物は上記のように、スフェロプラスト技術または全細胞増殖リチウム酵母形質転換系により *ピキア* (*Pichia*) 細胞内へ移される。

所望の表現型および遺伝子型である形質転換された株はバッチまたは連続モードで発酵槽中で増殖される。メチトロフ酵母中の組換え DNA に基づく生成物の大規模生産には、三段階、高細胞密度発酵系が現在好適な発酵プロトコルとして用いられている。最初の段階（または増殖段階）では、発現宿主は非誘導炭素源（例えばグリセロール）を過剰に含む限定最小培地中で培養される。そのような炭素源での増殖では異種遺伝子発現は完全に抑制され、異種蛋白質を発現しない細胞塊の発生が可能である。この増殖段階の間、*P. パストリス* (*pastoris*) 細胞は一般にその最適な増殖に約 5 の pH を好んでいるので、培地の pH を約 5 に維持することが現在のところ好適である。次に、さらに細胞塊を増加させ、メタノール応答性プロモーターを抑制するため、短い期間、非誘導性炭素源制限増殖を行う。この制限増殖期間の培地の pH は適切な pH 値に維持される（使用される実際の pH は発現に使用された特定の宿主株および発現される生成物に依存する）。

制限条件下での増殖期間に続いて、ブロスからの生成物の同時除去による連続式法；またはブロスのメタノール含量が低レベルに維持されるバッチ方法（ここでは「メタノール過剰供給バッチモード」と称される）により発酵槽にメタノールが添加される。メタノールの添加はメタノール応答性プロモーターにより制御されている遺伝子の発現を誘導する。この第 3 段階は、この段階で大多数の組換え生成物が発現されるので生産段階と称される。生産段階の間の培地の pH は適切な pH 値に維持される（用いられる実際の pH は発現に使用される特定の宿

主株および発現される特定の生成物に依存する）。

用語「培養」とは細胞増殖の助けとなる培地中での細胞の増殖、およびそのすべての増殖培養を意味している。用語「増殖培養」とは別の培養の増殖細胞（増殖）の細胞培養、または問題とする増殖培養および原培養間で実施された増殖培養工程の数は無関係に、原培養の任意の増殖培養を意味している。

本発明の好適な実施態様に従うと、蛋白質分解感受性生成物の生産に使用される異種蛋白質発現系は、非常に効率が良く厳密に制御される *P. パストリス* (*pastoris*) のメタノール制御 *AOX1* 遺伝子から誘導されたプロモーターが利用される。この遺伝子は両様に転写ターミネーター源でもありうる。現在好適な発現カセットは、お互いに機能的に作動する *P. パストリス* (*pastoris*) *AOX1* プロモーター、随意の分泌シグナル配列をコードしている DNA、蛋白質分解感受性生成物（例えば成膜 *IGF-1*、*EGF*、*GRF* など）をコードしている DNA 配列、および *P. パストリス* (*pastoris*) *AOX1* 遺伝子から誘導された転写ターミネーターを含んでいる。好適には一つの隣接する DNA 断片上の複数の発現カセットを得るため、一つの DNA 断片上に、先端-末端の配向で二つまたはそれ以上のそのような発現カセットが含まれている。

多発現カセットで形質転換されるべき好適な宿主細胞は現在のところ、形質転換 DNA 断片上に存在するマーカー遺伝子で補足できる少くとも一つの突然変異を持つ *P. パストリス* (*pastoris*) 細胞である。好適には *HIS4⁺* (*GS115*) または *ARG4⁺* (*GS190*) 単一独立栄養性突然変異体 *P. パストリス* (*pastoris*) 株が用いられるが、*HIS4⁺/URA3⁺* (*GS4-2*) または *HIS4⁺/ARG4⁺* (*PPF1*) 二重独立栄養性突然変異体 *P. パストリス* (*pastoris*) 株も用いられる。

一つまたはそれ以上の発現カセットを含む断片は宿主の代謝欠陥を補足するマーカー遺伝子および随意に細菌マーカー遺伝子、ベクター組み込みを方向付ける酵母 DNA 配列などを含むプラスミド内へ挿入される。

本発明の特定の實施態様に従うと、オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子を含む *ピキア* (*Pichia*) 属の種から得られる単離 DNA 断片が提供される。オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子はしばしば *U*

RA3 と称される。例えばそれは *URA3⁺* 欠失株の補正に使用できる。*ピキア* (*Pichia*) ゲノムの特定の部位を（即ち、*URA3* 部位への）DNA の目標とさせる能力が本新規遺伝子の別の使用法である。もしくはこの新規遺伝子は配列番号 4 に示したものと同一アミノ酸配列を實質的に持つ蛋白質をコードしていると特許付けできる。当業者は上記のアミノ酸配列は種々のヌクレオチド配列によりコードできることを認識しているであろうが、上記のアミノ酸配列をコードしている好適なヌクレオチド配列は配列番号 3 に示された配列と實質的に同一である。

本発明の別の特定の實施態様に従うと、組換え DNA 物質で形質転換できる宿主として（宿主はオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子欠失している）*ピキア* (*Pichia*) 属の酵母細胞が提供される。*URA3* が欠失した宿主株は、無傷の形の *URA3* 遺伝子を含む DNA による形質転換に使用でき、それにより所望の形質転換が起こったかどうかを容易に決定できる（形質転換が成功した細胞ではウラルシ原栄養性が異なることにより）。

URA3⁺ピキア (*Pichia*) 株と *ピキア* (*Pichia*) オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ マーカー遺伝子の組み合わせは、蛋白質分解活性を欠く *ピキア* (*Pichia*) の組換え株の生産に使用するための特に有用な選択系を提供する。そのような選択系はここでは「二方向性選択法」と称される。蛋白質分解活性を欠く *ピキア* (*Pichia*) の発生のためのこの選択系は、欠失遺伝子を含む DNA 断片が宿主生物のゲノムへ付加され、続いて内在性標的遺伝子配列および組み込まれたベクター配列間の相対的組換えにより宿主から DNA 断片の一部および内在性配列を除去する「ポップ-イン-ポップアウト」遺伝子破壊技術を使用する。最初に、形質転換体は *URA3* のようなマーカー遺伝子を含む破壊ベクターの取り込みにより選択される（即ち、「ポップ-イン」工程）。次に、選択された形質転換体は内在性遺伝子配列および組み込まれたベクター配列間で組換えが起こり、それによりマーカー遺伝子を含むベクターの一部および宿主の内在性配列が切り出された株を同定するためにスクリーニングされなければならない（即ち、「ポップ-アウト」工程）。*URA3* 遺伝子および *URA3⁺* 宿主に基づく二重選択系で所望の株の連続的同定が行われる。

この型の遺伝子破壊は典型的には、5-フルオロ-オロチン酸 (5-FOA) 耐性により同定できる *URA3* 株で実施される。破壊されるべき標的遺伝子の欠失コピーおよび機能的 *URA3* 遺伝子を破壊ベクターは含んでいる。*URA3* 宿主細胞のゲノムへの破壊ベクターの組み込みは、一つの機能的標的遺伝子および一つの非機能的 (即ち、破壊された) 標的遺伝子を含む *URA3* 形質転換体を生産させる。*URA3* 形質転換体はウラシル非存在下で増殖できるその能力により、容易に同定される。

組換えにより、欠失遺伝子のみを残して機能的標的遺伝子が除去された株を単離するため、組換えに伴う *URA3* 遺伝子の損失 ("ポップアウト") により生じた 5-FOA 耐性の復元で *URA3* 形質転換体がスクリーンされた。*URA3* 遺伝子型の再生はゲノム中の他の遺伝子の残存による破壊のための "ポップイン-ポップアウト" 過程の繰返しを可能にする。蛋白質分解活性を欠く *Pichia* (*Pichia*) 株の発生にこの選択系を使用するためには、*Pichia* (*Pichia*) 蛋白質分解経路に含まれる蛋白質をコードする遺伝子の修飾形および *URA3* 遺伝子を含む DNA 構成物で *URA3* 宿主が形質転換される。遺伝子付加による形質転換 DNA の部位特異的組み込みにより (即ち、"ポップイン")、蛋白質分解活性に直接または間接的に影響を及ぼす遺伝子の座位に一つの機能的および一つの非機能的な遺伝子ならびに無害の *URA3* 遺伝子を得る。*URA3* 遺伝子を取り込んだ株は陽性選択により同定される (当業者にはよく知られている技術を用いて、例えばウラシルを欠く最小培地上で株を増殖させ、そのような培地上で増殖できる株を選択することにより)。蛋白質分解活性に影響する蛋白質をコードしている遺伝子の座位での機能的、非機能的および *URA3* 遺伝子のコンフィギュレーションにより、機能的および非機能的遺伝子の一つおよび *URA3* 遺伝子の喪失を生じる機能的および非機能的遺伝子間の組換えが可能になる (即ち "ポップアウト")。

その後、細胞をウラシル経路中間体の非毒性類似体である 5-フルオロ-オロチン酸 (5-FOA) (*URA3* 株により代謝された場合、細胞にとって毒性のある化合物を生産する) を含む培地上に播種することにより、機能的 *URA3* 遺伝子を欠く株が陽性選択できる。なぜなら *URA3* 株はウラシル経路の特定

の点が阻害されているので 5-FOA を代謝せず、その毒性効果を受けない (従って "5-FOA 耐性" と称することができる)。対照的に *URA3* 株は 5-FOA を代謝して毒性化合物を生産し、それが *URA3* 細胞の増殖を防げる。得られる *URA3* 細胞は機能的標的遺伝子も欠いており、蛋白質分解活性が欠失されている。*URA3* 表現型は復元されるので、得られる細胞は選択可能マーカーとして *URA3* を再び用いて形質転換できる。

ウラシル経路中間体の毒性類似体を用いて、機能的 *URA3* 遺伝子を欠く株を陽性選択できるため、これを *Pichia* (*Pichia*) 宿主に複製の表現型変化を与える非常に都合の良い "ポップアウト" 法として使用できる。

同じ種の野生型株中に存在する蛋白質分解活性と比較して蛋白質分解活性が欠失されている *URA3* *Pichia* (*Pichia*) 株は天然形の *URA3* 遺伝子および蛋白質分解感受性生成物を含む発現ベクター (両方とも同一のベクターの一部として、または宿主内へ形質転換される第二のベクターとして) での形質転換に特に有用である。ウラシル栄養性が復元されたこれらの形質転換体は (簡単なスクリーニング法により容易に決定できる)、それらの中に蛋白質分解感受性生成物をコードしている遺伝子を取り込んでいるはずであり、従って生成物発現に直接利用できよう。

本発明はここで以下の実施例を参照しながらより詳細に説明されるが、以下の実施例に制限されるわけではない。

実施例

実施例 I: *P. pastoris* (*pastoris*) PEP4 遺伝子の単離

P. pastoris (*pastoris*) PEP4 遺伝子は、相同的な *Saccharomyces cerevisiae* (*Saccharomyces cerevisiae*) PEP4 遺伝子の放射性標識断片とハイブリダイズするその能力を利用してバクテリオファージ ラムダからの EMBL3 *P. pastoris* (*pastoris*) ゲノム DNA ライブラリーから同定された。ハイブリダイズした組換えファージ DNA を含む陽性ブランクを単離することにより *P. pastoris* (*pastoris*) PEP4 遺伝子がクローン化された。

A. *P. pastoris* (*pastoris*) EMBL3 ゲノム DNA ライブラリー

一の実例

バクテリオファージ λ が *P. pastoris* (*pastoris*) PEP4 遺伝子のクローニングのための運搬体として使用された。*P. pastoris* (*pastoris*) ゲノム DNA の *Sau*3A 部分消化の断片が細菌宿主中の組換え DNA の増殖に必須のバクテリオファージ λ ゲノムの要素を含んでいるバクテリオファージ λ ベクター EMBL3 [Frischauf, A. -M. et al. (1983), *J. Mol. Biol.* 170: 827] 内へ挿入された。*P. pastoris* (*pastoris*) DNA 含有 EMBL3 ベクターはインビトロで感受性ビリオンへパッケージされバクテリオファージ λ *P. pastoris* (*pastoris*) ゲノム DNA ライブラリーを得た。ライブラリーの増殖は組換えウイルスで感染させた大腸菌宿主細胞中の組換え DNA の増殖により達成された。

ガラス薄液電泳技術 [Cregg et al. *Mol. Cell. Biol.* 5: 3376-3385 (1985)] を用いて単離された *Pichia pastoris* (*Pichia pastoris*) ゲノム DNA (NRRL Y-11430 株, Northern Regional Research Center, Peoria, IL) は 0.1 μ g/μg の有効濃度で、37°C にて 7、14、21 および 28 分のインキュベーションによる *Sau*3A の消化を実施した。各々のインキュベーション混合物の一部は消化された DNA 断片の大きさを決定するため 1% アガロースゲル上、電気泳動により分離された。7 および 14 分インキュベーションされた消化物は主として 9-23 kb 断片から成っていると思われた。これらの消化物をブールし、下記のように調製された EMBL3 ベクター アームへ運搬した。

EMBL3 ベクター アームはベクター (EMBL3 クローニングキット, Stratagene, Cloning Systems, San Diego, CA から得られた: カタログ番号 241211) の *Bam*HI および *Eco*RI による二重消化により調製された。スタッフ断片からアームを分離している小さな *Bam*HI/*Eco*RI リンカーはエタノールによる選択的沈殿により消化物から除去された。1 μ g の EMBL3 前消化アームへの *Sau*3A 消化 *Pichia* (*Pichia*) ゲノム DNA (0.5 μ g) の割合は 5 μ l の反応混合物の 4

℃、2 日間のインキュベーションにより達成された。

P. pastoris (*pastoris*) ゲノム DNA 断片および EMBL3 ベクター アームの割合により調製された組換えバクテリオファージ DNA はインビトロで市販のパッケージング抽出物 (Stratagene, EMBL3 クローニングキット) を用いてパッケージングされた。EMBL3 に基づく *P. pastoris* (*pastoris*) ゲノムライブラリーは組換えファージをプロファージ P2 を含む大腸菌宿主株 P2 392 (Stratagene, EMBL3 クローニングキットで提供されている) とともに播種することにより増殖された。野生型バクテリオファージは大腸菌株 P2 392 中では増殖しない。P2 感受性を与える野生型遺伝子の二つを欠く組換え EMBL3 によるバクテリオファージはこの P2 含有大腸菌株中でよく増殖できる。増殖において、宿主株として大腸菌 P2 392 を使用すれば、細菌宿主中組換えファージのみが増殖することが保証される。

EMBL3 に基づく *P. pastoris* (*pastoris*) ゲノム DNA のすべてのプレートに SM 緩衝液 (5.8 g NaCl, 2 g MgSO₄·H₂O, 50 ml 1M トリス·HCl, pH 7.5, および 5 ml 2% ゼラチンを 1 リットルに含む) を層積した。5 時間後、上澄み液を棄てブールし、説明書に従って力価およびゲノム当量を計算した。このライブラリーは約 10⁸ ゲノム当量を含んでおり、その力価は 6 × 10¹¹ プラーク形成単位/ml (pfu/ml) であった。

B. プローブとして *S. cerevisiae* (*cerevisiae*) PEP4 遺伝子を用いる EMBL3 *P. pastoris* (*pastoris*) ゲノム DNA のスクリーニング

PEP4 遺伝子に対する *Pichia* (*Pichia*) ゲノムを充分にスクリーンするため、50,000 の組換えファージおよび大腸菌宿主株 P2 392 (Stratagene, EMBL3 クローニングキットで提供される) を 4 つの大きな 150 mm プレートに播種した。6-7 時間増殖させた後、プレートを 4°C に冷やした。各々のプレートをマークし、各々のプレートのプラークリフトの複製は各々のプレート上にニトロセルロースを置くことにより調製した。フィ

ルターを酸性させ、中和し、続いて、S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4遺伝子 [Thomas Stevens, University of Oregon, Eugene, Oregonの研究室から入手した S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4遺伝子を含む、ゲルで精製された S. セレビジエ (cerevisiae) DNAの³²P標識 0.6 kb 断片: Rothman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3248-3252 (1986) 参照] で標識された。ハイブリダイゼーションは 30%ホルムアルデヒド、6×SSC、5×デンハート溶液、20mM トリス・HCl: pH8.0, 1mM EDTA, 0.1% SDS および 100 μg/ml サケ精子DNAを含む溶液中、37℃で実施された。ハイブリダイゼーション後、2×SSC および 0.1% SDS を用い直温で3回フィルターを洗浄した。これらの最初の洗浄に続いて、2×SSC および 0.1% SDS を用いて55℃にて2回洗浄した。

S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4遺伝子の断片にハイブリダイズするDNAを含む15の陽性ブランクのオートラジオグラムから二通り (in duplicate) 同定された。15の陽性ブランクの各々の周りの領域を単離し、SM緩衝液中に置いた。単離物のうちの6つを 10^{-1} および 10^{-2} の希釈で大量菌株 LE392 と共により小さな100mmプレートに播種した。第1のブランクスクリーニングで使用されたものと同一のハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下、各々のプレートのシングル ブラクリフトが S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4遺伝子断片で標識された。この2回目のスクリーニングにおいてオートラジオグラム上12の陽性ブランクが検出された。これらのシングルブランクの9つが単離され、SM緩衝液中に置かれた。これらの9つのブランクの各々が 10^{-1} および 10^{-2} の希釈で大量菌株 LE392 と共により小さな100mmプレートに播種された。再び、最初の2回のスクリーニングで使用したものと同一のハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下、S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4遺伝子断片で各々のプレートのシングル ブラクリフトが標識された。各々のプレートはプレートに均等に分布する約10-20のブランクを含んでいた。フィルターのオートラジ

グラムが得られた。S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4遺伝子断片に対するサザンブロットハイブリダイゼーションにより各々のクローンからのDNAの制限酵素断片の分析により、クローンの2つの組の両方とも同じ大きさの二つのハイブリダイズする断片を含んでいることが明らかにされクローンの二つの組はプローブハイブリダイズした共通の置かれたDNA配列を持っていることが示された。

D. クローン化 P. パストリス (pastoris) PEP4遺伝子のサブクローニングおよび特徴づけ

プローブとして相関的な S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4遺伝子を用いる EcoRI 消化 P. パストリス (pastoris) ゲノムDNAのサザン ブロット ハイブリダイゼーションにより決定されたごとく、P. パストリス (pastoris) PEP4遺伝子は P. パストリス (pastoris) ゲノムの10.6 kb EcoRI 断片内に含まれている。実施例1Cに記載したごとくクローン4721の EcoRI 消化DNAのサザン ブロットハイブリダイゼーションは、それが S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4遺伝子にハイブリダイズした10.6 kb断片を含んでいることを明らかにした。クローン化 P. パストリス (pastoris) PEP4遺伝子の操作を容易にするために、単離4721からのDNAの EcoRI 断片上に含まれる P. パストリス (pastoris) ゲノムDNAが pUC19 内へサブクローニングされた。クローン4721 (25 μg) が300 μlの総容量中、EcoRI (60単位) にて消化された。消化DNAは0.65%アガロースゲル上で分離され、DE81ペーパーで10.6 kb EcoRI 断片が単離された。精製断片は400 μlの1M NaClでペーパーから洗い出され、フェノール/クロロホルムで抽出された。DNAは次にエタノールで沈殿され、10 μlの総容量で水に再懸濁された。約50 ngの10.6 kb断片は EcoRI で切断され、脱リン酸化されている等量の pUC19 に連結された。連結混合物は大量菌株 MC1061の形質転換に使用された。アンピシリン耐性コロニーが選択され、診断10.6 kb EcoRI 断片の存在をコロニーDNAの制限酵素消化物の分析によりスクリーニングした。大量菌プラスミド調製物は正しいプラスミド (p

オグラムにより各々のプレート上のすべてのブランクが PEP4 プローブにハイブリダイズしたことが明らかにされた。

異なるプレートから5つの別々のブランクを単離し、SM緩衝液中へ置いた。これらの単離物の3つ (各々4721, 5111および5131と称される) の大量菌培養からDNAが、置換えファージに含まれている PEP4 遺伝子の同定、特徴付けおよびサブクローニングのためにバクテリオファージ単離の標準法 [Maniatis, T., Fritsch, E. F. および Sambrook, J., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA (1982)] を用いて調製された。

C. S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4遺伝子にハイブリダイズした EMBL3P. パストリス (pastoris) ゲノムDNAライブラリーの単離物中の挿入物の特徴づけ

EMBL3P. パストリス (pastoris) ゲノムDNAライブラリーからの3つの単離物 (4721, 5111および5131, 上記参照) から調製された置換えファージDNAは種々の制限エンドヌクレアーゼで消化され、0.8%アガロースゲル上で分離され、エチジウムブロミド染色により可視化された。さらに、これらの消化物の1 μlが第2のアガロースゲル上で分離され、ニトロセルロース上にプロットされ放射性標識 S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4遺伝子の断片で標識された。30%ホルムアルデヒド、6×SSC、5×デンハート溶液、20mM トリス・HCl, pH8.0, 1mM EDTA, 0.1% SDS および 100 μg/ml サケ精子DNAを含む溶液中、37℃でハイブリダイゼーションが実施された。続いてフィルターは2×SSC および 0.1% SDS を用いて直温で5分間3回、続いて2×SSC および 0.1% SDS を用いて55℃で5分間2回洗浄した。

2つのクローン (5111および5131) からのDNAの同じ消化物がエチジウムブロミド染色により決定され、同じパターンで制限酵素断片が得られたが、第3のクローン (4721) からのDNAの同じ消化物からは異なる断片パタ

EP202と名付けられた) を含むコロニーから作製された。プラスミド pEP202 は完全 P. パストリス (pastoris) PEP4遺伝子を含んでいる (図1参照)。

クローン化 P. パストリス (pastoris) PEP4遺伝子の配列分析を容易にするために、P. パストリス (pastoris) PEP4遺伝子の一部が pUC19 内へサブクローニングされた。プラスミド pEP202 は BamHI および EcoRI で消化された。反応混合物は0.7%アガロースゲル上で分離され、DNAの0.45 kb BamHI 断片 (図1参照) がDE81ペーパーを用いて単離された。精製断片は BamHI による消化により直鎖状化され、脱リン酸化されている pUC19 (20 ng) と連結された。連結混合物は大量菌株 MC1061の形質転換に使用された。形質転換体はアンピシリン耐性で選択され、シングル BamHI 断片の存在をコロニーDNAの制限酵素消化物の分析でスクリーニングした。この形質転換から生じるシングルコロニーは適切なDNA構成物を含んでいることが観察され、pEP205 と名付けられた (図2参照)。

プラスミド pEP202 の配列分析で S. セレビジエ (cerevisiae) の PEP4 遺伝子と70%の相同性を持つDNA配列と同定された。pEP202 のこの配列によりコードされているアミノ酸配列は S. セレビジエ (cerevisiae) PEP4遺伝子によりコードされている配列と89%相同的である。

実施例11: P. パストリス (pastoris) の PEP4 欠失 (PEP4⁻) 株の開発

A. P. パストリス (pastoris) PEP4遺伝子破壊ベクター pDR401 の作製

P. パストリス (pastoris) の PEP4 欠失 (PEP4⁻) 株の開発に使用するためベクター pDR401 が作製された。このベクターは、P. パストリス (pastoris) の PEP4 株の形質転換に使用された場合、野生型 PEP4 遺伝子の置換による宿主ゲノム内へ組込まれる、欠陥のある P. パストリス (pastoris) PEP4遺伝子を含んでいる。

pDR401 は以下のごとく2工程法で作製された。第1の工程では、pEP

202からpDR401作製における基質ベクター(基質ベクターpEP301)が作製された。ベクターpEP301はpUC19配列およびpEP202からのクローン化P. パストリス (pastoris) PEP4遺伝子を含んでいる。プラスミドpEP202 (15 μ g)はSacIで消化された。5.5 kb SacI断片(SacIリンカーから時計回りに5時のSacI部位まで広がった断片、およびすべてのpUC19配列およびPEP4遺伝子を含んでいる; 図1参照)がDE81ペーパーを用いて0.7%アガロースゲルから単離された。断片は400 μ lの1M NaClでペーパーから溶出され、400 μ lのフェノール/クロロホルムで抽出され、エタノールで沈殿された。このDNAは1 μ lのリガーゼおよび1 μ l (~10 ng)のDNAを含む100 μ lの溶液中でそれ自身と連結された。連結混合物は室温で1時間インキュベートされた後、大腸菌株MC1061の形質転換に使用された。アンピシリン耐性コロニーが選択され、シングル5.5 kb BglII断片の存在をコロニーDNAの制限酵素消化物の分析によりスクリーニングした。プラスミドDNAは正しいプラスミド(pEP301と名付けられた、図3)を含むMC1061の形質転換コロニーから調製された。

pDR401の作製の第2工程においては、P. パストリス (pastoris) HIS4遺伝子がPEP4含有プラスミドpEP301内へ挿入され、最終ベクターが得られる。P. パストリス (pastoris) HIS4遺伝子はpYJ8AClaから調製される2.6 kb BglII断片[Cregg, J., et al., Mol. Cell. Biol., 5:3376-3385 (1985)]から単離された。プラスミドpYJ8ACla (15 μ g)はBglIIで消化され、消化されたDNAは0.7%アガロースゲル上で分離された。2.6 kb断片含有HIS4遺伝子は400 μ lの1M NaClで溶出してDE81ペーパーから単離され、400 μ lのフェノール/クロロホルムで抽出され、エタノールで沈殿されて10 μ lの水に再懸濁された。この2.6 kb BglII断片のpEP301の特異的BglII部位への挿入に先立って、約20 μ gのpEP301がBglIIで消化され、脱リン酸化されおよびフェノール/クロロホルムで抽出された。次に、約50 ngの2.6 kb HIS4含有断片

を約50 ngのBglII消化pEP301と、1 μ lの緩衝液、1 μ lのリガーゼおよび水を含む総量で10 μ lの溶液中で連結させることにより2.6 kb HIS4含有断片がpEP301内へ挿入された。結合は室温で3時間実施され、連結混合物はMC1061細胞の形質転換に使用された。アンピシリン耐性コロニーから調製されたプラスミドDNAはBglII, SallI, BglII/SallI, BglII/SallI, PvuI, NcoIおよびKpnIで消化され、pDR401の作製が確認された。制限断片パターンは正しいプラスミドpDR401に期待されるものと一致した(図4参照)。プラスミドpDR401はPEP4構造遺伝子内の特異的BglII部位にP. パストリス (pastoris) HIS4遺伝子が挿入されたpUC19であり、したがってPEP4構造遺伝子を破壊している。

B. pDR401の断片によるHIS4P. パストリス (pastoris) 株のGS115の形質転換

P. パストリス (pastoris) のPEP4株を作り出すため、HIS4 PEP4 P. パストリス (pastoris) 株GS115 (ATCC 20864) がスフェロプラスチ法(米国特許第4,879,231号参照)に従ってpDR401の5.3 kb EcoRI/SacI断片20 μ gで形質転換された。pDR401のこの断片はHIS4遺伝子含有PEP4欠失遺伝子と一致している。この型の組込みにより生じる形質転換は原核性であり、それに基づいて非形質転換細胞から区別できる。形質転換の頻度は約 10^{-2} μ g⁻¹ DNAであった。

C. 形質転換体の特徴付け

1. 形質転換体カルボキシペプチダーゼY活性の分析

His⁺形質転換体は次にコロニーオーバーレイ比色スクリーニング法[Jones, E. Genetics 85:23-33 (1977) 参照]を用いてカルボキシペプチダーゼY活性が分析された。このアッセイでは、His⁺形質転換体細胞は寒天プレートから離されプレート当り~300コロニーの密度でYEPD(酵母抽出物, 1%ペプトン, 2%デキストロスおよび2%寒天)プレート上で増殖された。細胞の透過性を上げるため、プレートに40%ジメチルホ

ルムアミド(DMF)を含む0.6%アガロースゲルおよび1.2 mg/mlの基質APNE(N-アセチルDLフェニルアラニン β -ナフチルエステル)を散布させた。細胞は透過性を上げられるため、細胞の液相含有物のいくつかは試薬APNEに近づくことができる。アガロースオーバーレイが固化後、プレートを5 mg/mlファースト ガーネット塩の溶液中に浸漬した。APNEはカルボキシペプチダーゼYのエステル分解活性により切断される。この反応の生成物はファースト ガーネット塩に結合してコロニー中染色を誘発する。カルボキシペプチダーゼY活性を欠くコロニーはガーネット塩に暴露後最初の10-15分の間に赤色/ピンク色中心が覆われた。対照的に、PEP4遺伝子が欠失しているコロニーはこの色の発色が遅く、赤色PEP4⁺コロニーと比較してピンク色と区別された。このアッセイの結果に基づいて低いカルボキシペプチダーゼY活性を持つことが明らかにされたコロニー(即ち、PEP4⁺コロニーの指標としての強い赤色を発色しなかったコロニー)が単離され、マスタープレートに移され、対照コロニーとともに融代培養され、オーバーレイアッセイを用いて再びスクリーニングされた。再び強い赤色を発色しなかった20のコロニーが、ベクターpDR401の断片の組込みによりこれらの形質転換体のPEP4座位が破壊されているかどうかを決定するサザンブロットハイブリダイゼーションによる分析のために選択された。

2. サザンブロットハイブリダイゼーション分析

低カルボキシペプチダーゼY活性を示した20の形質転換体株(p1-p20と称される)からゲノムDNAが抽出され、SacIおよびEcoRIで消化された。この過程はHIS4含有PEP4欠失遺伝子を株の形質転換に使用された5.3 kb EcoRI/SacI断片として選離させるはずである。これらの消化DNAから2つのサザンブロットフィルターが調製された; 1つのブロットはクローン化P. パストリス (pastoris) PEP4遺伝子の一部を含むpEP301(図3参照)からの放射性標識1.4 kb XbaI/EcoRV断片で探査され、他のブロットはHIS4遺伝子を含むpDR401からの放射性標識2.6 kb BglII断片で探査された。比較の目的でSacIおよびEcoRIで消化されている形質転換体株GS115からの対照DNAも分析された。

9RIで消化されている形質転換体株GS115からの対照DNAも分析された。

SacIおよびEcoRIによるGS115からのゲノムDNAの消化によりpEP301の放射性標識XbaI/EcoRV断片中に含まれているPEP4遺伝子の一部にハイブリダイズする2.9 kb断片が得られた。対照的にこのプローブは分析された20の形質転換体のうちの19からのSacI/EcoRI消化DNA中の異なった大きさの断片にハイブリダイズした。株p17からのDNAのみが菌株からのDNAハイブリダイゼーションパターンと同一のパターンを与えた。残りの19株は非破壊PEP4座位に特徴的な2.9 kbハイブリダイズ断片を欠き、PEP4遺伝子プローブへハイブリダイズする約5.3 kb断片および/またはより大きな断片を含んでいた。5.3 kb断片はSacI/EcoRIによる消化によりベクターpDR401から放出される形質転換DNAと同じ大きさであった。

株p1-p16およびp18-p20からのDNAのサザンブロットハイブリダイゼーションの結果は、これらの株は無傷のHIS4遺伝子とともに欠損PEP4遺伝子を含んでおり株のPEP4座位は破壊されていることを示している。P. パストリス (pastoris) のPEP4株のより大規模な培養物のプロスの蛋白質分解活性を分析するため、実験例11に記載されているように株p13が1リットル発酵で増殖された。

3. 形質転換体プロテイナーゼA活性の分析

a. プロトコール

8つの形質転換体のプロテイナーゼA活性がJones et al.の方法[Genetics 102:655 (1982)]に基づく酵素アッセイを用いて評価された。いくつかの対照株もまたこのアッセイで評価された: PEP4およびS. セレビジエ (cerevisiae) のPEP4株(株DBY747および20B12、各々Yeast Genetic Stock Center, University of California, Berkeley, CAから)およびP. パストリス (pastoris) のPEP4野生型株(株NRRL Y-11430, Northern Regional Rease

arch Center, Peoria, IL)。

プロテイナーゼAはアスパルテル プロテアーゼ活性に関与する液性酵素であり、S. セレビジェ (cerevisiae) のPEP4遺伝子によりコードされている。形質転換体細胞抽出物のプロテイナーゼ活性の評価に使用される方法は酸性性ヘモグロビンからのプロテイナーゼ媒介アミノ酸放出の測定に基づいている。形質転換体細胞抽出物は酸性性ヘモグロビンとインキュベートされ、抽出物中に存在するプロテイナーゼA活性はゼロ時間と90分のインキュベーション後に放出されるアミノ酸の量の相違を算定することにより決定された。

S. セレビジェ (cerevisiae) 対照株DBY747 (PEP4) および20B12 (PEP4⁻)、PEP4 P. パストリス (pastoris) 株NRRL Y-11430およびP. パストリス (pastoris) の実験PEP4株の培養物をYEPD培地で定期まで増殖させた。培養細胞(20 OD₆₀₀単位)を10mMアジ化ナトリウム中で洗い、次に400μlの100 mMトリス、pH7.5中細胞と懸濁液を1分間ボルテックスすることにより溶解させた。溶解細胞はエーペンドルフチューブ中で10分間遠心分離して細胞破片を除去した。遠心後に得られた上澄液(粗抽出物)は以下のごとくプロテイナーゼA活性が試験された。酸性性1%ヘモグロビン(400μl)を50μlの粗抽出物に加え、37℃で90分間インキュベートした。0.2mMの1N過塩素酸の添加により反応を停止させた。遠心分離により不溶性物質を除去し、200μlの0.31M NaClを200μlの上澄液に加えた。この溶液の40μlに対し、遊離アミノ酸のためのPierce BCA蛋白質アッセイキット(例えば米国特許第4,839,295号参照)を用いてアッセイを行った。90分間インキュベーションを行った試料中に存在する遊離アミノ酸の量がブランク(ゼロ時間)で停止された反応混合物の試料から成る中に存在する量と比較された。これら2つの試料間の遊離アミノ酸の相対的相違がプロテアーゼA活性の尺度である。

b. 結果

対照および形質転換体のプロテイナーゼAアッセイの結果(表1参照; ΔODが試料中の遊離アミノ酸の濃度の尺度である)はS. セレビジェ (cerevisiae)

のPEP4⁻株のプロテイナーゼA活性はS. セレビジェ (cerevisiae) のPEP4⁻株のそれのたった10%であることを示している。同様に、PEP4形質転換株(株p1, p2, p5, p8, p13, p16およびp20)のプロテイナーゼA活性もS. セレビジェ (cerevisiae) のPEP4⁻株のそれの約10分の1のみである。P. パストリス (pastoris) のPEP4野生型株はS. セレビジェ (cerevisiae) のPEP4⁻株の約半分のプロテイナーゼA活性を示した。

表1

プロテイナーゼAアッセイ結果

株	表現型	ΔOD/μg蛋白質
DBY747(<u>S. セレビジェ(cerevisiae)</u>)	PEP4 ⁺	28.1
20B12(<u>S. セレビジェ(cerevisiae)</u>)	PEP4 ⁻	2.7
<u>P. パストリス(pastoris)</u> 対照 (NRRL Y-11430)	PEP4 ⁺	13.1
p13	PEP4 ⁻	3.3
p20	PEP4 ⁻	4.2
p17	PEP4 ⁺ (?)	7.5
p16	PEP4 ⁻	0
p15	PEP4 ⁻	0
p13	PEP4 ⁻	3.3
p8	PEP4 ⁻	3.3
p5	PEP4 ⁻	5.0
p2	PEP4 ⁻	6.6
p1	PEP4 ⁻	6.0

欠失PEP4遺伝子によるPEP4株の形質転換により発生されたPEP4 P. パストリス (pastoris) 株のプロテイナーゼAアッセイで得られたデータは、形質転換により破壊された形質転換体のPEP4遺伝子を示したこれらの形質転換体からのDNAのサザンブロット分析の結果と一致した。

実施例III: P. パストリス (pastoris) のPEP4株の発酵

A. 方法

ベクターpDR401のPEP4遺伝子含有SacI/EcoRI断片で株GS115を形質転換することにより発生させたP. パストリス (pastoris) のPEP4株、p13はグリセロールバッチ増殖相、制菌グリセロール供給バッチ相およびメタノール供給バッチ相からなる相プロトコールに従って以下のごとく1リットル発酵により増殖された。

1000mlの最小増殖地(21ml 85%リン酸、0.9g硫酸カルシウム・2H₂O、14.3g硫酸カリウム、11.7g硫酸マグネシウムおよび3.2g水酸化カリウム)および2%グリセロールを含む2リットルの発酵槽をオートクレーブした。殺菌後、4mlのPTM₁微量塩溶液[6g/l硫酸銅・5H₂O、0.8g/lヨウ化ナトリウム、3g/l硫酸マンガン・H₂O、0.2g/lモリブデン酸ナトリウム・2H₂O、0.02g/lホウ酸、0.5g/l塩化コバルト、20g/l塩化亜鉛、86g/l硫酸第一鉄・H₂O、0.2g/lピオチンおよび5ml硫酸)を発酵槽に添加し、濃NH₄OHでpHを5に調整した。増殖のpHは0.1%ストルクトルJ673泡消剤を含む50%N H₄OHを添加することにより5に維持された。接種物は緩衝化酵母培養基(YNB)グリセロールプレート(リン酸緩衝化YNB、2%グリセロール、2%寒天)から調整され、2%グリセロールを含むリン酸緩衝化YNB(11.5g/L, KH₂PO₄、2.66g/L K₂HPO₄、0.67%酵母要素塩基、pH5)中30℃にて一夜増殖させた。1-8のOD₆₀₀まで増殖されている培養細胞の10-50mlを発酵槽に接種し、バッチ増殖をグリセロールが枯渇するまで約1日の間続ける。グリセロール枯渇した時点で(溶存酸素の増加により示される)、10ml/hでのグリセロールの供給(50%グリセロールに12ml/LのPTM₁を加えたもの)を開始し、40mlのグリセロールが添加されるまで続けられた。グリセロール供給の終了後、メタノールの供給(100%メタノールに12ml/LのPTM₁を加えたもの)を約2ml/hの初期速度で開始した。3時間後メタノール供給速度を6ml/hに増加させた。メタノール供給速度は12-18時間6ml/hに維持し、次に10ml/hに増加

し、発酵を継続する間10ml/hに維持された。400mlのメタノールが発酵槽に添加された後、容器を取り出した。

B. 試料調製

発酵培養の試料(15mlづつ)は発酵工程を通して種々の時間間隔で発酵槽から取り出した。各々の試料は8500×gで5分間遠心分離してブロスおよび細胞を分離した。これらの時点でのNH₄OH、泡消剤・グリセロールおよびメタノール濃度のレベルが記録された。上澄中のメタノールおよびエタノール濃度はPorapak Qカラム(Alltech)を用いるガスクロマトグラフィーにより決定された。

さらに、培養物の湿重重量が発酵槽中の細胞増殖の指標として決定された。この目的のためには、発酵培養物の1mlをマイクロフュージ中4分間遠心分離し、上澄液を傾斜させて捨て、湿重ペレットを秤量した。

C. 結果

1リットル発酵中のP. パストリス (pastoris) p13のPEP4株の増殖は発酵の間種々の時間で発酵培養物の湿重細胞重量(g/l)を決定することによりモニターされた。発酵のメタノール供給バッチ相の間のp13株の増殖の時間変化は、類似の1リットル発酵の間のHIS4 PEP4株G+PA0804H2(野生型HIS4遺伝子を含む発酵ベクターでHIS4 PEP4 P. パストリス (pastoris) 株GS115を形質転換することにより発生する)の増殖の時間変化と比較した場合、P. パストリス (pastoris) のPEP4株の増殖能力はPEP4株のそれと匹敵することが示された。

実施例IV: 1リットル発酵で増殖されたP. パストリス (pastoris) のPEP4株のブロスの蛋白質分解活性の分析

P. パストリス (pastoris) PEP4遺伝子の破壊がP. パストリス (pastoris) のブロス蛋白質分解活性の変化を伴ったかどうかを決定するため、PEP4株、株p13、およびPEP4株の1リットル発酵からのブロスの蛋白質分解活性が比較された。この研究においては、2つの異なるペプチド、表皮増殖因子(EGF; 米国特許出願番号323,964号に記載されている)と、標品53アミノ酸EGF分子の最初の52アミノ酸から成る断片で

合成された分子) および成長ホルモン放出因子 (GRF: EP205783に記載されているごとく組換えで合成された) が別々に PEP4 P. パストリス (pastoris) 株 p13 の 1 リットル発酵からの細胞を含まないブロス中で、および HIS4 PEP4 P. パストリス (pastoris) 株 G+P AO804H2 の同様な 1 リットル発酵からの細胞を含まないブロス中で室温にてインキュベートされた。特定の期間のインキュベーションの後、各々のインキュベーション混合物の一部が逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により試験されて (下に記載) 各々の試料中に残存する無傷のペプチドの量が決定され、それによりペプチドの蛋白質分解の程度が決定された。

A. 逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

緩衝液および P. パストリス (pastoris) 株の発酵からのブロス中の EGF および GRF ペプチドの分析に使用された逆相 HPLC 系は、Waters 600 (Bedford, MA) 溶剤送液システム、Waters モデル 481 Lambda Max 可変波長検出器、Wisp 710 B オートインジェクターおよび Shimadzu Chrom-Pac 検分器 (Cole Scientific, Moorepark, CA) である。PEP4 P. パストリス (pastoris) 株 p13 および HIS4 PEP4 P. パストリス (pastoris) 株 G+P AO804H2 の発酵によるブロス試料は 0.1 M リン酸ナトリウム、pH 5.0 で 1:10 に希釈した。15 マイクロリットルの濃縮 GRF 貯蔵液が 285 μ l の希釈ブロスに添加され 4 時間インキュベートされた。リン酸緩衝液で同様に希釈した GRF 貯蔵液もまた対照として 4 時間インキュベートされた。60 マイクロリットルの EGF 貯蔵液は 240 μ l の希釈ブロスまたは緩衝液に添加され、8 時間インキュベートされた。各々のインキュベーション混合物試料は別々に、Waters μ Bondapak C18 逆相カラムにインジェクトされた。20-60% 移動相 B (95% アセトニトリル、5% 水、0.1% トリフルオロ酢酸) の 20 分での直線濃度勾配によりペプチドがカラムから溶出された。移動相 A (0.1% トリフルオロ酢酸) は溶出濃度勾配を制御する移動相 B の希釈に使用された。

B. 結果

(chla) ゲノム ライブラリ中で同定される。P. パストリス (pastoris) URA3 遺伝子はライブラリー DNA で形質転換され、ウラシルを欠く培地上で増殖できる大腸菌株 CSH-28 のコロニーを単離することによりクローニングされた。

A. P. pastoris (P. パストリス) YEp13 ゲノム DNA ライブラリー

プラスミド YEp13 [Broach 等, Gene 8: 121-133 (1979)] は、S. cerevisiae (S. セレビジエ) (2 μ レプリコン) と E. coli (大腸菌) (pBR ori) の両方の複製の起源を含む便利なシャトルベクターである。さらに、YEp13 は大腸菌の形質転換の選択的マーカーとして用いるための Amp^r (アンピシリン耐性) 遺伝子と、S. セレビジエにおける選択的マーカーとして用いるための LEU 遺伝子 (ロイシン生合成経路遺伝子) とを含む。P. パストリス (菌株 NRRL Y-11430) ゲノム DNA ライブラリーは、Cregg 等が述べているように [Mol. Cell. Biol. 5: 3376-3385 (1985)]、プラスミド YEp13 を用いて作製されている。

B. URA3 遺伝子に関する P. パストリス YEp13 ゲノム DNA ライブラリーのスクリーニング

pyrF 大腸菌株 CSH-28 [Miller, J. H., Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州, コールドスプリングハーバー (1972) を参照のこと] はオロチジン-5'-ホスフェート デカルボキシラーゼ活性を有せず、合成培地上で増殖する場合にウラシルを必要とする。S. セレビジエ URA3 遺伝子が大腸菌における pyrF 突然変異を相補できることは実証されている [Rose, M., Grisafi, P. 及び Botstein, D., Gene 29: 113-124 (1984)]。それ故、大腸菌株 CSH-28 の pyrF 突然変異を相補できる P. パストリス URA3 遺伝子に関して P. パストリス YEp13 ゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングするために、このライブラリーからの DNA によって、大腸

0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 5.0、中に含まれている無傷の EGF または GRF およびブロス中に含まれている EGF または GRF の HPLC 分析で得られたクロマトグラムを比較することにより無傷のペプチド [PEP4 P. パストリス (pastoris) 株の発酵ブロス中および P. パストリス (pastoris) 株 G+P AO804H2 のブロス中でインキュベートされた EGF または GRF 分子] の量が評価された。標準の無傷のペプチドの HPLC 分析によるクロマトグラムは試料中に存在する標準ペプチドの量およびペプチドの特有の保持時間を反映した主ピークから成っている。対照的に両方のペプチドの蛋白質分解断片は無傷のペプチドに関連した保持時間と異なった種々の長さの時間 HPLC カラム上に保持される。従って、両方のペプチド (EGF または GRF) の蛋白質分解断片の HPLC 分析からのクロマトグラムはピークの数および大きさおよび断片化に伴う保持時間などが無傷のペプチドの HPLC 分析で得られるクロマトグラムと異なっている。これらの相違に基づいて、ブロスインキュベーション試料中の無傷の EGF または GRF ペプチドの量を算定することが可能であった。

PEP4 P. パストリス (pastoris) 対照ブロス中でインキュベートされた GRF および EGF 試料の HPLC 分析に基づくと、PEP4 株 G+P AO804H2 の発酵からのブロス中でインキュベーションした後、10% 未満の各々の 2 つのペプチドが無傷で残っていることが決定された。対照的に、PEP4 P. パストリス (pastoris) 株のブロス中のこれらのペプチドの蛋白質分解のレベルは PEP4 株のブロス中よりも著しく低い (4 時間のインキュベーション後でも >60% の GRF が無傷で残存; 8 時間のインキュベーション後でも >90% が無傷で残存)。これらのデータは P. パストリス (pastoris) の PEP4 遺伝子の破壊は株のブロス中の蛋白質分解活性をかなり減少させることを示している。

実施例 V: P. パストリス (pastoris) URA3 遺伝子の単離

P. パストリス (pastoris) URA3 遺伝子は、大腸菌株 CSH-28 中の pyrF 突然変異 (オロチジン-リン酸デカルボキシラーゼ活性の欠失に対応する) を補足するその能力でプラスミド (YEp13) に基づくピキア (P

菌株 CSH-28 を形質転換した。

形質転換 CSH-28 細胞をウラシルを含まない半合成培地上に置いた。形質転換細胞はこの培地上で増殖しなかった。ウラシルを含まない平板培地 (plate) 上で増殖できる CSH-28 形質転換細胞 (P. パストリスゲノムライブラリー DNA によって形質転換) は 10⁶ 形質転換用 DNA μ g の濃度で発生した。増殖のためにウラシルを必要としない形質転換細胞 10 個からプラスミド DNA を単離した。これらのプラスミドを大腸菌株 CSH-28 の形質転換に用いた。10 個のプラスミドの中の 10 個がこの菌株のウラシル要求性を高頻度で相補した。P. パストリス YEp13 ゲノムライブラリー DNA による CSH-28 の形質転換によって発生した選択形質転換細胞の一つは 6.6 kb SphI フラグメントを含む 9.0 kb インサートを収容する。6.6 kb SphI フラグメントをさらに分析するために pUC19 の SphI 部位にサブクローニングした。

この形質転換細胞からのプラスミド DNA を SphI によって消化させ、0.6% アガロースゲル上の電気泳動に供した。DE81 ペーパーを用いて 6.6 kb フラグメントを単離し、このペーパーから 1M NaCl 400 μ l によって溶出した。DNA はフェノール/クロロホルム 400 μ l によって抽出し、エタノールによって沈殿させた。次に、6.6 kb フラグメントをアルカリホスファターゼ処理 SphI 消化 pUC19 と結合させた。この結合混合物を用いて大腸菌 MC1061 細胞を形質転換させた。アンピシリン耐性形質転換細胞を制限酵素消化コロニー DNA の分析によって 6.6 kb SphI フラグメントの存在に関してスクリーニングした。この正確なプラスミドは pPU201 と名付けられた。プラスミド pPU201 を用いて CSH-28 を形質転換させた、このプラスミドはこの菌株のウラシル要求性を相補することができた。

C. プラスミド pPU201 におけるインサートの特性化

pPU201 を種々の酵素によって消化させ、生ずるフラグメントを DNA 長さコンピュータープログラム (MapSort; ウィスコンシン大学 Genetics, ウィスコンシン州, マジソン) を用いて分析して、フラグメントの大体のサイズを判定することによって、プラスミド pPU201 中の P. パストリス

DNAの6.6 kbインサートの制限酵素認識部位の地図(図5)を作成した。pPU201の6.6 kbインサート中に含まれるURA3遺伝子を正確に転写するために、pPU201の各制限酵素消化物の5 ngアリコートを用いて、1%アガロースゲル上での電気泳動によって分離させ、ニトロセルロースに移し、*C. tr*
opicalis (C. トロピカリス) URA3A遺伝子の放射性標識1.3 kb *Bgl*
*III*フラグメントによって画定(PCT公報第WO90/09449号を参照のこと)。25%ホルムアミド、6xSSC、5xDenhardt溶液、20mM Tris・HCl、pH8.0、1mM EDTA、0.1%β-デシル硫酸ナトリウム(SDS)及び100 μg/mlサケ精子DNAを含む溶液を用いて、フィルターをこのプローブに27℃においてハイブリッド形成した。ハイブリッド形成後、フィルターを1xSSCと1%SDSを用いて、室温において、1回洗浄につき5~10分間かけて、3回洗浄し、次に0.5xSSCと0.5%SDSを用いて、45℃において、1回洗浄につき10分間かけて、2回洗浄した。これらの緩和な条件は互いに異なるURA3遺伝子配列の間のハイブリッド形成を可能にした。pPU201の各消化物の追加のサンプルを同じ1%アガロースゲル上で分離し、ハイブリッド形成フラグメントと非ハイブリッド形成フラグメントとを比較するためにメチルエチジウムによって染色した。ハイブリッド形成フラグメントとpPU201の制限マップとの比較は、pPU201中のURA3遺伝子を図5に示す約1.3 kb *Nco*
I-Sal
*I*フラグメントに属在化することを可能にした。これを知ることによって、次には、P. バストリスURA3遺伝子の塩基配列を決定し、さらに特性化するために適したサブクローンを構成することが可能になった。

pPU201をEcoRVとPstIとによって消化させ、URA3遺伝子を含む約4.0 kbフラグメントを単離し、これをpUC19中にSmaIとPstI部位において融合することによって、プラスミドpPU202(図6)を形成した。pPU202をそれぞれ、SacI、KpnI及びEcoRIによって消化させ、大量(200 μl)に再結合させることによって、プラスミドpPU203、pPU205及びpPU206(図7-9)を形成した。クローン化P. バストリスゲノムインサートDNAフラグメント中並びにpPU202のpUC

クローン化pPEP205(pUC19配列と、pPEP202から誘導される450 bp BamHIフラグメントに含まれるPEP4遺伝子部分とから成る)にクローン化させた。これは、pPEP205のXbaI-SphI部位(図2参照)中に2 kb SpeI-SphI DNAフラグメントとしてpPU205からのURA3遺伝子(図8参照)をサブクローン化することによって実施した。

プラスミドpPU205をSpeIとSphIとによって消化させ、この反応混合物を0.8%アガロースゲル上で分離させた。URA3遺伝子を含む2 kb DNAフラグメントをDE81ペーパーを用いてゲルから単離させ、清浄し、精製した。プラスミドpPEP205をXbaIとSphIとによって消化させた。pPU205から単離させた2 kb URA3遺伝子含有SpeI-SphIフラグメントをXbaI/SphI消化pPEP205に結合させ、この混合物を用いて大腸菌株MC1061をアンピシリン耐性に形質転換させた。アンピシリン耐性コロニーを、BamHI/SphI制限酵素消化コロニーDNAの2.7 kb、0.4 kb、1.9 kb診断フラグメントの存在に関する分析によってスクリーニングした。形質転換体はpDR421と名付けられた正確なDNA構造を有するプラスミドを含むことが判明した(図10)。

2. IGF-1発現URA3 P. バストリス菌株(IGF-U)のpDR421による形質転換

P. バストリスのURA3 IGF-1発現菌株、IGF-U、をpDR421によって形質転換させて、P. バストリスのPEP4、IGF-1発現菌株を発生させた。

a. IGF-Uの発生

5-フルオロオロチン酸(5-FOA)はウラシル生合成経路中間体の類似体であり、これはUra⁺菌株によって消化されるときに有害な化合物を生ずる。Ura⁺菌株によるウラシル生合成経路はある一定の段階においてブロックされるので、これらの菌株は5-FOA(細胞にとって有害な化合物を形成する)を代謝せず、このため5-FOA耐性である。これに反して、Ura⁻菌株は5-FOAを代謝し、5-FOA含有培地では生き残ることができない。それ故、5-FOA含有培地での細胞培養は自然突然変異によってUra⁻菌株を発生

19ポリリンカー中にこれらの酵素の各々の認識部位が存在するので、この方法はpPU202中のこれらの部位の間のDNAの便利な除去を可能にした。生ずるプラスミドを次に用いて、大腸菌株CSH-28を形質転換させて、各欠損遺伝子がpyrF突然変異を相補するか否かを判定した。この結果はpPU203とpPU205がウラシルを含まない合成培地上でpyrF菌株の増殖を可能にする機構URA3遺伝子を含むが、pPU206は含まないことを実証した。これらの研究結果はpPU201におけるP. バストリスURA3遺伝子の地図作成(mapped)位置と一致する。

推定の(putative)URA3遺伝子を有するP. バストリスゲノムDNAフラグメントのサブクローンをSangerジデオキシ方法によって塩基配列決定した[Sanger等のProc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467(1977)を参照のこと]。この構造遺伝子と約100 bpのフランキング配列との塩基配列を両方向において調べて、配列番号3に表す。クローン化P. バストリスURA3遺伝子から誘導されるアミノ酸配列(配列番号4を参照のこと)は、S. セレビジェURA3遺伝子から誘導されるアミノ酸配列との73%相同を有し、C. トロピカリスのURA3AとURA3B遺伝子から誘導されるアミノ酸配列との71%相同を有し、Kleuvero myces lactis(クロイベロミセス ラクセス)URA3遺伝子から誘導されるアミノ酸配列との72%相同を有する。

実施例VI: ビキアのIGF-1発現PEP4欠失(PEP4⁻)菌株の発生

A. 遺伝子添加によるIGF-1発現PEP4菌株の発生

1. P. バストリスPEP4遺伝子破壊ベクターpDR421の形成

内因性PEP4座に不完全PEP4遺伝子を加えることによる、宿主PEP4遺伝子の破壊によって、ビキア バストリスのPEP4欠失(PEP4⁻)菌株の発生に用いるためのプラスミドpDR421を形成した。このベクターはPEP4遺伝子の内部部分を含み、この部分はP. バストリスのPEP4菌株の形質転換に用いる場合に、PEP4座において宿主ゲノムに結合して、PEP4遺伝子の不完全な非機能性コピーを発生させる。

破壊ベクターpDR421を発生させるために、ビキアのURA3遺伝子を選

させるための方法として用いることができる(例えば、Boeke等, Mol. Gen. Genet. 197:345-348(1984)を参照のこと)。

IGF-1発現菌株G+IMB206S1のURA3誘導体[この菌株の説明に関しては、ここにその全体において参考文献として開示する、1990年9月4日出願の共通に譲渡された米国特許出願第07/578,728号を参照のこと]は、ウラシル補充5-FOA含有培地[0.67%酵母要素塩基、2%酵母、2%グルコース、5-FOA 750 mg/lとウラシル48 mg/l]中にこの菌株の5x10⁷細胞を直接培養することによって形成された。30℃における1週間の培養後に、この平板上で増殖するIGF-Uと名付けられたコロニーを単離した。増殖のためにウラシルを必要とする、このコロニーはビキア バストリスのURA3菌株を相補することができなかった。

b. IGF-Uの形質転換

pDR421約20 μgをBglIIIによって消化させ、標準スフェロプラス形質転換法によるIGF-Uの形質転換に用いた。形質転換体を8日間わたるウラシル不存在下で増殖しうるか否かによって選択した。

3. 形質転換体の特性化

a. 形質転換体カルボキシペプチダーゼY活性の分析

Ura⁺形質転換体を、次に実施例IIに述べるようなコロニーオーバーレイ比色検査方法によって、カルボキシペプチダーゼY活性に関して分析した。この分析結果に基づいて低カルボキシペプチダーゼY活性を有するように思われるUra⁺形質転換体のコロニー(すなわち、PEP4⁻コロニーを指示する強い赤色を呈色できなかったコロニー)を単離し、マスターブレイス(master plate)に移し、対照コロニーと共に継代培養し、オーバーレイ分析法を用いて再スクリーニングした。再度強い赤色を呈色することができなかった1コロニーをM+IMB206S1と名付けた。

b. リットル発酵と10リットル発酵とで増殖したP. バストリスのIGF-1発現PEP4菌株の完全なIGF-1発現レベルの分析

1. P. バストリスのIGF-1発現PEP4菌株の発生

実施例VI. A. 2. b. に述べたように形成されたP. バストリスのIGF

—1発現PEP4菌株, M+IMB206S1をグリセロールバッチ増殖相、制限グリセロール供給バッチ相及びメタノール供給バッチ相から成る三相プロトコールによる1リットル発酵と10リットル発酵において増殖させた。P. パストリスのPEP4 IGF-1発現菌株間の完全IGF-1発現レベルを比較するために、IGF-1遺伝子発現カセットの4コピーと6コピーをそれぞれ含む、P. パストリスの2種PEP4菌株, G+IMB204S14とG+IMB206S1を次のように比較可能な発酵において増殖させた。

1リットル発酵プロトコール

2リットル発酵器 (Bio la f i t t e, ニュージャージー州、プリンストン) に最少塩培地 900ml (85%リン酸 21ml、硫酸カルシウム2H₂O 0.9gと、硫酸カリウム 14.3gと、硫酸マグネシウム11.7gと、水酸化カリウム 3.2g) とグリセロール30gとを加えて、オートクレーブ処理した。滅菌後に、PTM₁微量 (trace) 塩溶液 (硫酸第二銅・5H₂O 6g/l、ヨウ化ナトリウム 0.08g/l、硫酸マンガニ・H₂O 3g/l、モリブデン酸ナトリウム・2H₂O 0.2g/l、ホウ酸 0.02g/l、塩化コバルト 0.5g/l、塩化亜鉛 20g/l、塩化亜鉛 20g/l、硫酸第一鉄・H₂O 65g/l、ビオチン 0.2g/l、及び硫酸 5ml) 4mlを発酵器に加え、pHを濃NH₄OHによって5に調節した。pHは0.1%St r u k t o l J 673消泡剤 (起泡を制御するために加える) を含む50%NH₄OHの添加によって調節した。温度を30℃に維持し、溶解酸素を攪拌、通気、又は酸素を含む空気供給 (feed) の補充の強化によって飽和の20%以上に維持した。

2%グリセロールを含む緩衝化 (buffered) YNB中で30℃において一晚増殖させた細胞から接種物を形成した。発酵器にOD₅₅₀ 2~8までに増殖させた培養細胞40~70mlを接種し、バッチ増殖法 (growth regime) をグリセロールが消費されるまで18~24時間続けた。溶解酸素濃度の増加によって指示されるグリセロール消費の時点で、グリセロール供給 (50%w/vグリセロール プラス 12ml/L PTM₁) を10ml/時で開始した。pH5.0発酵では、培養物のpHを発酵を通して5に維持した。

(100%メタノール プラス 12ml/L PTM₁) を20ml/時の速度で開始した。メタノール供給の開始と共に、pHコントローラーの設定点を2.8に調節した。次にpHは細胞代謝の結果として、設定点値まで徐々に低下した。4時間のメタノール供給後に、メタノール供給速度を60ml/時に高め、この速度に全体で約72時間維持し、72時間目に容器を回収した。

4. PEP4 IGF-1発現菌株間のIGF-1発現レベル

P. パストリスの組換え体IGF-1分泌菌株の発酵で産生される数形式のIGF-1の一つは、ジスルフィド結合によって一連に維持される2個以上のIGF-1分子フラグメントから成る、ニックが入った (nicked) 種である。これらのフラグメントはIGF-1分子のアミノ酸バックボーンの1個以上のペプチド結合のタンパク分解開裂によって形成された。ニックドIGF-1分子と完全IGF-1分子とは見かけの分子量 (非還元性条件下で、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって測定) に基づいては識別不能であるので、これらの種は非還元性条件下での逆相HPLCによって、また還元性条件下 (すなわち、例えばジチオスレイトールのような還元剤の存在下) でのSDS-PAGEによって分離することができる。ニックが入ったIGF-1のフラグメントを保持するジスルフィド結合の還元は、完全な分子よりも小さい分子量を有する、タンパク分解によって生ずる個々のフラグメントを遊離させる。

IGF-1発現レベルの定量

細胞を含まないブロスにおけるニックドIGF-1と真正の (authentic) (完全な、正確に折り畳まれた、モノマーの) IGF-1の収量を定量逆相HPLCによって測定した。用いたHPLC系は、C18カラムの代わりにVydac C4カラム (0.46x5cm) を用いた以外は、実施例IVで述べた系と同じであった。1%分相配の25~42%移動相をカラムに1ml/分の流速で17分間通して、このカラムからサンプルを溶出した。検出器を0.05吸光度単位フルスケール (AUFs) にセットし、最大感度のために215nmの波長を用いた。

P. パストリス ブロス中の真正IGF-1種とニックが入ったIGF-1種

低pH発酵 (すなわち、pH2.8又はpH3.5) では、グリセロール供給の開始後に、pHコントローラーの設定点を所望のpHに調節した。4時間後に、細胞代謝の結果として培養物のpHはこの設定点値にまで低下した。この低いpHを発酵の残りを通して維持した。次にグリセロール供給を停止し、メタノール供給 (100%メタノール プラス PTM₁ 12ml/L) を2ml/時の速度で開始した。3時間のメタノール供給後に、供給速度を6ml/時に高め、この速度を発酵の残りに対して維持した。メタノール供給の開始から72時間後に、容器を回収した。

発酵をNH₄OH、消泡剤、グリセロール、メタノール、エタノール、及び塩細胞重量レベルに関して実施例IIIに述べたように監視した。ブロス (broth) サンプルと細胞サンプルも実施例IIIに述べたように発酵を通して回収した。

10リットル発酵プロトコール

5. 5リットルの全量で、10X基本塩 (85%リン酸 42ml/l、硫酸カルシウム・2H₂O 1.8g/l、硫酸カリウム 28.6g/l、硫酸マグネシウム 23.4g/l、水酸化カリウム 6.5g/l) 3.5リットルとグリセロール 220gとを含む15リットル発酵器を滅菌した。発酵器が冷却した後に、PTM₁微量塩 24mlを加え、pHを2%水酸化アンモニウムの添加によって5に調節した。pHは同溶液の添加によって調節した。起泡はSt r u k t o l J 673の5%溶液の添加によって制御した。温度は30℃に維持し、溶解酸素は攪拌、通気、反応器圧の強化によって又は酸素を含む空気供給の補充の強化によって飽和の20%以上に維持した。2%グリセロールを含む緩衝化酵母富栄養塩基 (YNB: KH₂PO₄ 11.5g/L, K₂HPO₄ 2.66g/L、酵母富栄養塩基 6.7g/L、pH6) 中で一晚増殖させた細胞から接種物を作製した。発酵器にOD₅₅₀ 2~8までに増殖させた培養細胞500~700mlを接種し、バッチ増殖法を18~24時間続けた。溶解酸素濃度の増加によって指示されるグリセロール消費の時点で、グリセロール供給 (50%w/vグリセロール プラス 12ml/L PTM₁) を100ml/時で開始し、4時間続けた。次にグリセロール供給を停止し、メタノール供給

とをHPLCによって識別するために、ブロス サンプルをHPLCカラムに負荷する前にブロスから若干の内因性P. パストリス汚染物を除去することによって、ブロスを洗浄することが必要であった。これは、このブロスを0.25mlカラムに含まれるスルホプロピルベースドカチオン交換樹脂に通すことによって達せられた。この樹脂を最初に0.2M酢酸によって洗浄し、次に0.02M酢酸 2mlと平衡化させた。一定量の細胞を含まないブロス (1ml) をカラムに負荷し、このカラムを0.02M酢酸 1mlによって洗浄した。IGF-1を0.02M 酢酸ナトリウム、pH5.5、プラス 1M NaClの2mlによって溶出した。溶出液の最初の1mlは全IGF-1の75~80%を含み、通常は回収された唯一の溶出量であった。カラムを次に100%メタノール 2mlによる洗浄によって再生し、それによって再使用のために利用可能にした。

ビキア-産生IGF-1のレベルの定量のために、既知量の標準IGF-1 (Amgen, カリフォルニア州、オークス) をHPLCカラムに注入し、クロマトグラムの対応ピーク下の面積を測定した。面積をHPLCカラムに負荷したIGF-1のμgに対してプロットすることによって、標準曲線を形成した。HPLCクロマトグラム ピーク下の面積をIGF-1濃度に換算するために用いる相関係数を標準曲線から算出した。検出器を0.05AUFsと215nmの波長にセットした場合に、相関係数はカラムに注入したIGF-1について350単位/μgであった。この情報を用いて、洗浄されたブロス サンプル中に存在する正確に折り畳まれた、完全なモノマーIGF-1の濃度を、サンプルのHPLC分析からのクロマトグラムの対応ピーク下の面積の測定によって、算出することが可能であった。この相関係数を用いて、ニックが入ったIGF-1種の大体の濃度をも同様に算出した。しかし、ニックが入った種の絶対濃度は完全IGF-1とニックが入ったIGF-1の固有相関係数の差に依存して変動する。

1リットル発酵の結果

該PEP4 IGF-1発現菌株の1リットル低pH (pH2.8) 発酵は一貫して、PEP4 IGF-1発現菌株の1リットル低pH発酵 (~160~190mg/L) よりも多量の総モノマー (真正 プラス ニックド) IGF-1

($\sim 200-250 \text{ mg/l}$) を生成した。さらに、該 PEP4 菌株のプロス中の真正 IGF-1 の割合は PEP4 菌株のプロスにおける同割合 (6.5%) よりも多少高かった (7.7%)。しかし、該 PEP4 菌株と PEP4 菌株とのモノマー IGF-1 産生レベルの非常に大きい明白な差が、これらの菌株の pH5.0 発酵において検出された。PEP4 IGF-1 発現菌株、G+IMB204S14 と G+IMB206S1 との 1 リットル pH5.0 発酵においては IGF-1 は本質的に検出されなかった。この結果は、PEP4 菌株の発酵において産生される真正 IGF-1 が pH5.0 においては大規模なタンパク分解を受けるが、低い pH ではごく限定されたタンパク分解を受けるに過ぎないことを示す。これに反して、該 PEP4 IGF-1 発現菌株 M+IMB206S1 の 1 リットル pH5.0 発酵は少なくとも 200 mg のモノマー IGF-1/l を生じ、その約 80% は真正 IGF-1 であった。従って、該 PEP4 IGF-1 発現菌株は PEP4 IGF-1 発現菌株に比べて pH5.0 における真正 IGF-1 の産生に関して有意に改良され、pH2.8 における真正 IGF-1 の産生に関して多少改良されたように見える。

10 リットル発酵の結果

P. バストリスの該 PEP4 IGF-1 発現菌株の 10 リットル発酵は、PEP4 IGF-1 発現菌株の 10 リットル発酵 ($\sim 170 \text{ mg/l}$) よりも多量の純モノマー IGF-1 ($\sim 200 \text{ mg/l}$) を生成した。

該 PEP4 菌株と PEP4 菌株の 10 リットル発酵において産生される純モノマー IGF-1 の組成も異なった。該 PEP4 菌株 M+IMB206S1 の 10 リットル発酵における純モノマー IGF-1 の 75% (164 mg/l) 以上が真正 IGF-1 であったが、PEP4 菌株 G+IMB204S14 の 10 リットル発酵における純モノマー IGF-1 の約 50% (88 mg/l) のみが真正 IGF-1 であった。

さらに、該 PEP4 菌株の発酵における細胞収率は PEP4 菌株の発酵における細胞収率よりも $\sim 30\%$ 低かったため、真正 IGF-1 の細胞当たりの収率は PEP4 菌株の発酵において非常に強化された。該 PEP4 菌株の発酵における細胞収率が低い結果として、該 PEP4 菌株の発酵から多量の細胞を含まないブ

ロスが回収された (PEP4 菌株の発酵から回収される細胞を含まないプロスの量に比べて)。これは該 PEP4 菌株の発酵からの分泌 IGF-1 の高レベルの回収を生ずる (PEP4 菌株の発酵から回収される分泌 IGF-1 量に比べて)。

上記結果は、該 PEP4 IGF-1 発現菌株が真正 IGF-1 の産生に関して、PEP4 IGF-1 発現菌株に比べて、大規模に改良されることを実証する。

B. 遺伝子置換による IGF-1 発現 PEP4 菌株の発生

1. P. バストリス遺伝子破壊ベクター pDR601 と pDR602 の形成

ベクター pDR601 と pDR602 とを、欠陥 PEP4 遺伝子による内因性 PEP4 遺伝子の置換による宿主 PEP4 遺伝子の破壊による PEP4 欠損 (PEP4⁻) 菌株の発生に用いた。このベクターは下記のように数工程で形成した (図 11 の線図も参照のこと)。

pUC19 配列と、pEP202 からのクローン化 P. バストリス PEP4 遺伝子とから成るプラスミド pEP301 (図 3 参照) を NcoI によって開裂し、次に DNA をエタノールによって沈降させ、回収し、再懸濁させ、連結反応混合物中に連結させた。この消化と連結は $\sim 0.5 \text{ kb}$ NcoI フラグメントに含まれる PEP4 遺伝子の内部部分を効果的に除去した。DNA を BglII によって消化させ、残りの複製プラスミドを直鎖状化し、この DNA を用いて、大腸菌株 MC1061 を形質転換させる。アンピシリン耐性コロニーを選択して、コロニー DNA の制限酵素消化物の分析によって、 0.5 kb NcoI フラグメントの存在に関してスクリーニングした。 $\sim 0.5 \text{ kb}$ NcoI フラグメントを有さない欠陥 PEP4 遺伝子を含む正確なプラスミドは pDL321 と名付けた。第 2 プラスミド、pUC19XX は、SmaI と HincII とによって pUC19 を開裂させ、再連結させ、BamHI と XbaI 部位を含むポリリンカー部分を効果的に除去することによって形成した。次に、プラスミド pUC19XX を SacI と EcoRI とによって切断し、 $\sim 10 \text{ ng}$ を pDL321 の SacI/EcoRI 2.2 kb フラグメントの $\sim 50 \text{ ng}$ と結合させた。このフラグメントはゲル精製され、DE81 ペーパーによって単離されたものである。この結合ミックスを用いて、MC1061 細胞を形質転換させ、Ba

EII/XbaI 消化コロニー DNA の分析によってアンピシリン耐性コロニーをスクリーニングした。正確な消化物パターンを示すプラスミドは pDL322 と名付けた。

次に pDL322 を XbaI によって切断し、 10 ng を配列 5'-CTAGCGGCCG-3' のオリゴヌクレオチドリンカー 10 ng と結合させた。このリンカーは XbaI 部位に結合されたときに XbaI 部位を破壊させ、独特の NcoI を形成した。この結合ミックスを用いて、MC1061 細胞を形質転換させた。アンピシリン耐性コロニーを NcoI 消化コロニー DNA の分析によってスクリーニングした。正確なプラスミドを pDL323 と名付けた。

ベクター pDR601 と pDR602 とを形成するために、ピキア URA3 遺伝子を下記のように pDL323 中に挿入した。プラスミド pPU205 (図 8 参照) を PvuII と AatI によって消化させ、約 2.5 kb PvuII フラグメント上の URA3 遺伝子を遊離させた。この消化物を 0.8% アグロースゲル上で分離させた。 $\sim 2.5 \text{ kb}$ フラグメントを DE81 ペーパーを用いてゲルから単離させ、溶出し、精製した。プラスミド pDL323 を EcoRV による切断によって直鎖状化した。この直鎖状化プラスミド ($\sim 10 \text{ ng}$) を pDU205 no URA3 含有 PvuII フラグメントと結合させて、挿入される URA3 遺伝子の配向に依存して、pDR601 と pDR602 とを形成した (それぞれ、図 12 と 13 を参照のこと)。

2. pDR601 と pDR602 とによる IGF-U の形質転換

URA3 IGF-1 発現 P. バストリス菌株 IGF-U (実施例 VI, A, 2. a を参照のこと) を pDR601 と pDR602 とから誘導された DNA の直鎖状フラグメントによって形質転換させた。この直鎖状フラグメントは各側で PEP4 遺伝子の一部をコードする DNA によってフラグメントされる URA3 遺伝子を含有した。このフラグメントの末端と PEP4 遺伝子との相同性はこのフラグメントの PEP4 座における組込みを制御し、遺伝子置換イベントを生じた。宿主ゲノム中へのいずれのフラグメントの安定な組込みも、フラグメントに含まれる URA3 遺伝子の存在のために原栄養性形質転換体を生じた。この形質転換は下記のように実施した：

pDR601 と pDR602 の両方を NotI と BglII とによって消化させることによって、各側で PEP4 遺伝子の一部をコードする DNA によってフラグメントされる URA3 遺伝子から成る直鎖状 DNA フラグメント ($\sim 4.0 \text{ kb}$ 長さ) を得た。消化された DNA ($20 \mu\text{g}$) を用いて、標準スフェロプラスト方法によって菌株 IGF-U を形質転換させた。再生培地上で増殖し、YEP D 培地上に絶代培養した形質転換体から単離した Ura⁺コロニーを実施例 II に述べたオーバーレイ方法によってカルボキシペプチダーゼ Y 活性に関してスクリーニングした。対照コロニーに比べて赤色を発色しなかったコロニーをサザンブロットハイブリッド形成による分析のために選択した。

3. 形質転換体からの DNA のサザンブロットハイブリッド形成

選択した形質転換体から Hoffman と Winston の方法 [Gene, 57: 267-272 (1987)] を用いて、ゲノム DNA を単離した。各菌株からのゲノム DNA を BatII によって消化させた。この処理は pDR601 又は pDR602 のフラグメントの組込み領域を含む PEP 座の一部を遊離させる。それ故、この領域のサイズは IGF-U のゲノム中への形質転換用 DNA の適切な組込みに特異的である。消化された DNA に対して 0.8% アグロースゲル上で電気泳動を実施し、ニトロセルロースフィルターにこの DNA をブロットした。このフィルターを P. バストリス PEP4 遺伝子の一部を含む pEP301 の放射能標識した 1.4 kb XbaI/EcoRV フラグメントによって、標準方法を用いて、ハイブリッド形成した (Maniatis, T., Fritsch, E. F. 及び Sambrook, J. Molecular Cloning, A Laboratory Manual 385-388 頁, Cold Spring Harbor press, 米国ニューヨーク州、コールドスプリングハーバー (1982))。ハイブリッド形成は 50% ホルムアミド、 $6\times \text{SSC}$ 、 $5\times \text{Denhardt}$ 溶液、 20 mM Tris HCl, pH8.0、 1 mM EDTA、 0.1% SDS 及び $100 \mu\text{g/ml}$ サケ精子 DNA を含む溶液中で 37°C において実施した。次にフィルターを $1\times \text{SSC}$ 、 0.1% SDS 中で 3 回 (1 回の洗浄につき 10 分間)、次に $0.5\times \text{SSC}$ 、 0.1% SDS 中で 65°C において 1 時間洗浄した。比較用対照としては、P. バストリス

菌株GS115、PEP4菌株、からのゲノムDNAをこの分析に含めた。

GS115からのゲノムDNAのBst Iによる消化は4.4 kb フラグメントを生じ、これはプローブ中に含まれるPEP4遺伝子の一部にハイブリッド化した。これに反して、このプローブは少なくとも二つの形質転換体、IGFU2601-5とIGFU2602-5とからのDNAの6.9 kb フラグメントにハイブリッド形成した。対照PEP4座に比べて大きいサイズの形質転換体PEP4座(6.9対4.4 kb)は、その構造領域内にURA3遺伝子を有する非機能性PEP4遺伝子による宿主PEP4遺伝子の置換と一致した。

これらの結果から、菌株IGFU2601-5とIGFU2602-5とが遺伝子置換による宿主菌株IGF-UのPEP4遺伝子の破壊によって生ずる幾つかのPEP4菌株の例であると結論された。

実施例VII: "POPOUT" ベクターを用いるPEP4遺伝子置換の形成

1. P. パストリス遺伝子破壊ベクターpDL521の形成

"pop-in/pop-out" 方法による宿主PEP4遺伝子の破壊によるP. パストリスのPEP4欠失(PEP4-)菌株の発生に、ベクターpDL521を用いた。この方法では、小欠失を含む欠陥PEP4遺伝子を宿主PEP4座に加え、PEP4座から機能性PEP4遺伝子を除去する(すなわち、pop-in/pop-out)。

pDL521は2工段で形成した。最初に、pDL323の2.2 kb EcoRI/SacIフラグメントと、pPU205の2.2 kb SacI/PstIフラグメントと、pUC19の2.7 kb EcoRI/PstIフラグメントとを三方向融合(three-way ligation)によって融合させて、中間体プラスミド、pDL501を形成した。これらの3フラグメントは次のようにして得た。P. パストリスURA3遺伝子を含むpPU205(図8)をPstIとSacIとによって消化させた。URA3遺伝子を含む2.2 kb PstI-SacIフラグメントをゲル分離し、DESB-1ペーパーを用いて精製した。完全PEP4遺伝子中に存在する0.5 kb NcoIフラグメントを欠いた欠陥PEP4遺伝子を含むプラスミドpDL323(図11参照のこと)をEcoRIとSacIとによって消化させた。欠陥PEP4遺伝子を含む2.

b. GS4-2の形質転換とPEP4菌株の発生

プラスミドpDL521をNotIによる消化によって直鎖状化した。PEP4遺伝子から配列が欠失して、この遺伝子を不完全にする部位の5'に隣接して、NotI部位を配置する。NotIフラグメントの両端はGS4-2の内因性PEP4遺伝子の配列に相同であり、このことはPEP4座における相同的組換えによるフラグメントの組換えを促進する。

His⁺Ura⁺菌株GS4-2を、スフェロプラスト方法に従って、NotIによる消化によって直鎖状化したpDL521 20 μgによって形質転換させた。形質転換体をそれらがウラシルを欠いた増地で増殖するか否かによって選択した。これらの形質転換体の12種を取り上げ、これらの形質転換体から単離した(実施例VJ、B、3に述べるように)ゲノムDNAをSacIによって切断し、0.8%アガロースゲル上で電気泳動を受けさせた。このDNAをニトロセルロースフィルターに移し、PEP4遺伝子の放射能標識1.2 kb EcoRV/XbaIフラグメントによって調べた。ゲノムDNAのサザンブロットハイブリッド化パターンに基づいて、PEP4座に組込まれたpDL521を有するように見える2菌株、GS4-2521-3とGS4-2521-4とをさらに選択するために選んだ。これらの菌株はURA3マーカー遺伝子を含有し、このマーカー遺伝子の片側には無傷の、完全なPEP4遺伝子を有し、他方の側には欠陥PEP4遺伝子(配列の~0.5 kbを欠く)を有する。この形態のPEP4座はPEP4遺伝子の2コピーの間の組換えを可能にし、PEP4遺伝子的一方とURA3遺伝子との脱離を生ずる(すなわち、pop-out)。この2種のPEP4遺伝子のいずれの一方もこの組換えイベントから脱離する(berevicted)ことができる。2種PEP4遺伝子間の組換えが生ずるかどうかが、また何時生ずるかを検証するために、菌株GS4-2521-3とGS4-2521-4とを5-FOAを含むYPD増地で連続10倍希釈法で培養した。Ura⁺菌株のみが5-FOAの存在下で増殖し、従って、このような増地で増殖が所望の組換えイベントの発生を裏付ける。5-FOA含有増地で増殖することができる菌株はPEP4遺伝子の2コピー間の組換えによって発生するウラシル要求型であった。Ura⁺コロニーは30℃における1週間の培養後に5-

2 kb フラグメントをゲル分離させ、DESB-1ペーパーを用いて精製した。pUC19をEcoRIとPstIとによって消化させた。3フラグメント(pUC19のEcoRI/PstI-消化フラグメント 0.02 μg、pPU205の2.2 kb PstI/SacIフラグメント 0.02 μg、pDL323の2.2 kb EcoRI/SacIフラグメント 0.02 μg)の三方向融合で融合させた。この融合ミックスを用いて、大腸菌MC1061を形質転換させた。アンピシリン耐性コロニーをNcoI消化コロニーDNAの分析によってスクリーニングした。正確に融合したフラグメントをpDL501と名付けた。次にpDL501をSacIによって消化させ、ウシアルカリホスファターゼによって処理し、0.02 μgをSacI消化pEP202から単離された1.9 kb SacIフラグメント0.02 μgと融合させ、DESB-1ペーパーを用いて精製した。これはpDL501中の欠陥PEP4遺伝子の3'末端にさらにPEP4フランキンゲン配列を加えて、P. パストリス宿主IGF-Uの形質転換中の内因性PEP4遺伝子による組換えのためにさらに多量の相同配列を保証した。この融合ミックスを用いて、大腸菌MC1061を形質転換させた。アンピシリン耐性コロニーからのDNAをBglIIとSpeIとによって消化させ、pEP202からの添加SacIフラグメントの存在を示す特徴的な0.8 kb フラグメントの存在に関してスクリーニングした。正確なプラスミドをpDL521と名付けた(図14参照)。

2. GS4-2のpDL521による形質転換

a. GS4-2の発生

pop-outプロセスによるPEP4菌株の発生に宿主として、P. パストリスのURA3菌株が必要であった。ウラシルを補充した5-フルオロオロチン増地(0.67%酵母窒素塩基、2%寒天、2%グルコース、750 ng 5-FOA/1及び48 mg ウラシル/1)における普遍的(general)HISA P. パストリス宿主菌株GS115の10⁶細胞の直接培養によってURA3菌株を発生させた。30℃における1週間のインキュベーション後に、平皿上で増殖したコロニーを単離した。このHis⁺Ura⁺菌株をGS4-2と名付けた。

FOA含有平皿上に出現した:これらのコロニーの中の10コロニーはGS4-2521-3から誘導されたものであり、これらのコロニーの中の14コロニーはGS4-2521-4から誘導されたものである。

3. 形質転換体の特性化

Ura⁺形質転換体コロニーの14コロニーを精製し、各々からゲノムDNAを形成し、EcoRIとEcoRVとによって消化させ、0.8%アガロースゲル上で電気泳動を受けさせ、ニトロセルロース上にブロットし、P. パストリスPEP4遺伝子の放射能標識1.2 kb XbaI/EcoRVフラグメントによってハイブリッド形成した。このようにして分析した14菌株体の中の7菌株体からのDNAは完全PEP4遺伝子に存在する~0.5 kbの配列を欠いた欠陥PEP4遺伝子のみから成るPEP4座と一致するハイブリッド化プロファイルを示した。これらの菌株の中の2種がGS4-2521-3/7とGS4-2521-4/1であった。

実施例VIII: P. パストリスのPRB-1遺伝子の一部のクローニング

プロテイナーゼB遺伝子、PRB-1はS. セレジアにおける液胞セリンエンドプロテアーゼをコードする[Moehle等, Mol. Cell Bio. 7: 4390-4399 (1987)]。同等の遺伝子の一部をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)遺伝子増幅法を用いてP. パストリスからクローン化した[例えば、Gould等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1934-1938 (1989)を参照のこと]。種全体に維持される、プロテイナーゼBタンパク質の領域をコードするPRB-1遺伝子配列への相同性を有する縮過オリゴヌクレオチド(Moehle等, 上記文献)をP. パストリスPRB-1 DNAのPCR増幅にプライマーとして用いるために合成した。このオリゴヌクレオチドは次の配列を有した:

オリゴヌクレオチド 1:

5'-GATAGAATTTCGACG GGT AAT GGT CAT GGT ACT CAT TGT GC-3'
C C C C C C C C C

オリゴヌクレオチド 2:

GA A A A
3'- GATCGCATGC AAT CCT GCA ACA TGT GGA GAT GCC AT-3'
G G G G G G CCG

増幅されたDNAフラグメントのシャトル プラスミドへのサブクローニングを促進するために、各オリゴヌクレオチドはその5' 末端に1箇以上の制限エンドヌクレアーゼ認識部位をも含んだ：オリゴヌクレオチド 2ではSph I部位、オリゴヌクレオチド 1ではPst IとEco RIの両部位。

PCR反応液はT. E. (10mM Tris HCl, 1mM EDTA) 2μl中のP. バストリス(NRRL Y-11430株)ゲノムDNA 100ngと、オリゴヌクレオチド 1 10μlと、オリゴヌクレオチド 2 10μlと、dGTP, dCTP, dATP及びdTTPの1.25mM溶液(16μl)と、10×緩衝液(500mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH8.3, 15mM MgCl₂) 10μlと、0.1%ゼラチンと、水70μlと、5単位/μl Taq DNAポリメラーゼ 0.5μlとから成るものであった。溶液を94℃において2分間加熱した。31回反復されるPCR循環反応は96℃における2分間の変性と、50℃における1分間のアニーリングと、72℃における3.5分間の重合を含むものであった。

このPCRの生成物をアガロースゲル上の電気泳動に供し、オリゴヌクレオチド 1と2に対応する位置間のPRB-1遺伝子の増幅生成物に予想されるサイズ(～500bp)のフラグメントをDE81ペーパー上で単離させ、Eco IとSph Iとによって消化させ、アガロースゲル上の電気泳動に供した。500bpフラグメントをDE81ペーパーによって単離させ、pUC19 10ngに結合させた。このpUC19はポリリンカー中でEco IとSph Iとによって消化されて、直鎖状化されたものである。この結合ミックスを用いて、大腸菌MC1061細胞を形質転換させた。アンピシリン耐性の形質転換体からの制限酵素消化プラスミドDNAを正確な500bp Eco I-Sph Iフラグメントの存在に関して分析した。1コロニーのみがpPRBPPと名付けられた、正確なプラスミドを含有した。

pPRBPPに含まれるP. バストリスPRB-1遺伝子のクローン化部分の

ロニ-DNAの分析によってスクリーニングした。正確なプラスミドをpDR911と名付けた(図15参照)。

B. GB4-2のpDR911による形質転換

P. バストリスのPRB-1菌株を形成するために、Bg1 IIによる消化によって直鎖状化されたpDR911による標準スフェロプラスト形質転換によって、GS4-2を形質転換させることができる。Ura^r形質転換体からのDNAのザンブロットハイブリッド化は、PRB-1座の破壊によって形成されるPRB-1菌株の確認を可能にした。形質転換体のプロテイナーゼB感受性分析[例えば、Jones等のGenetics 102:665-677(1982)を参照のこと]は、菌株のプロテイナーゼB欠失をさらに裏証する。

C. P. バストリスのprb-1, pep4菌株の発生

GS4-2521-4の単離体であるP. バストリスGS4-2521-4-5のpep4, ura3, his4菌株のPRB-1遺伝子(実施例VII参照)を、Bg1 IIによる開裂によって直鎖状化されたベクターpDR911による形質転換によって破壊した。Ura^r変異型を有する形質転換体を選択して、ザンブロットハイブリッド形成によって分析した。予想されるハイブリッド形成パターンを示す特定形質転換体をMG18と名付けた。この菌株をIGF-1の発現のための宿主として用いた。IGF-1発現菌株をC+IGF816S1と名付けた。

本発明をそのある一定の好ましい実施態様に関して詳述したが、ここに述べ、特許請求する本発明の要旨と範囲内で変換と変更が行われることは理解されよう。

配列をSangerジデオキシ法を用いて発生させ(Sanger等, 上記文献)、配列番号5に示す。P. バストリスPRB-1遺伝子のこの配列はS. セレブリエPRB-1遺伝子の配列に対して74%の相同性を有する。

実施例IX: P. バストリスのPRB-1菌株の発生

P. バストリスのPRB-1菌株の発生に用いるために、プラスミドpDR911を形成した。このベクターはP. バストリスのPRB-1菌株の内部部分を含み、これはP. バストリスのPRB-1菌株の形質転換に用いる場合に、宿主ゲノムにPRB-1座において組込まれ、PRB-1遺伝子の2種の不完全な非機能性コピーを形成する。ベクターpDR911はP. バストリスのURA3宿主菌株に選択性マーカーとして用いるために完全な機能性P. バストリスURA3遺伝子をも含む。

P. バストリスのPRB-1菌株の発生に用いるために、プラスミドpDR911を形成した。このベクターはP. バストリスのPRB-1菌株の内部部分を含み、これはP. バストリスのPRB-1菌株の形質転換に用いる場合に、宿主ゲノムにPRB-1座において組込まれ、PRB-1遺伝子の2種の不完全な非機能性コピーを形成する。ベクターpDR911はP. バストリスのURA3宿主菌株に選択性マーカーとして用いるために完全な機能性P. バストリスURA3遺伝子をも含む。

A. pDR911の形成

pPRBPP中のP. バストリスのPRB-1遺伝子フラグメントをPst IとSph IとによるpPRBPPの制限消化によって単離させた。この反応混合物を0.8%アガロースゲル上に負荷させ、0.5kbフラグメントをDE81ペーパーによって精製した。

この0.5kbフラグメントを直鎖状形のプラスミドpPU203に、P. バストリスURA3含有pUCベーストプラスミドに結合させた(図7参照)。プラスミドpPU203をSph IとPst Iによる開裂によって直鎖状化し、～10ngをピキアDNAフラグメント～100ngと結合させた。この結合混合物を用いて大腸菌MC1061をアンピシリン耐性に形質転換させた。アンピシリン耐性コロニーを特徴的なフラグメントに関するPst I/Sph I消化コ

配列表

配列番号1:

(I) 配列の特徴:

- (A) 配列の長さ: 2032塩基対
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 種の数: 不明
- (D) トポロジー: 不明

(II) 配列の種類: cDNA

(ix) 特徴:

- (A) 特徴を授け番号: CDS
- (B) 存在位置: 236...1468
- (ix) 特徴:
- (A) 特徴を授け番号: 成熟ペプチド
- (B) 存在位置: 236...1468

(xi) 配列: 配列番号1:

GAATTCATTA TGTGTGATTT AGGTAATCTT CCGGAATAGG AATAGTGGTT TGCGGCGATT	60
AATCGACCTT GCTTATATG GTAGTACCTT TGACGATATA GGTGGCACTT ATTGAAGACA	120
AAGCAAGCCA CTTTCTTTTA TGTGTAACTG TGTGGAAGCA AGCATCTTTA CTAGAGAAACA	180
TGTAAAGCAT TTAGATTCTT AGAGTTCGAT TCTCAATTA CTGATTAATCA ATTTAAAG	240
ATG ATA TTT GAC GGT ACT ACG ATG TCA ATT GCG ATT GGT TTG CTC TCT	268
Met Ile Phe Asp Gly Thr Thr Met Ser Ile Ala Ile Gly Leu Leu Ser	1 8 10 18
ACT CTA GGT ATT GCT GCT GAA GCG AAA GTT GAT TGT GGT AAG ATA CAC	334
Thr Leu Gly Ile Gly Ala Gly His Lys Val His Ser His Lys Ile His	20 25 30
AAG CAT CCA CTC TCA GAA ACT TTA AAA GAG GCG AAT TTT GCG CAG TAT	382
Lys His Pro Val Ser Glu Thr Leu Lys Glu Ala Asn Phe Gly Glu Tyr	35 40 45
GTC TCT GCT CTG GAA CAT AAA TAT GTT TCT CTC TTC AAC GAA CAA AAT	430
Val Ser Ala Leu Glu His Lys Tyr Val Ser Leu Phe Asn Glu Glu Asn	50 55 60
GCT TTC TCG AAG TCG AAT TTT ATG TCT CAG CAA GAT GGT TTT GCG GGT	498
Ala Leu Ser Lys Ser Asn Phe Met Ser Glu Glu Asn Asp Gly Phe Ala Val	65 70 75 80

GAA GCT TCC CAT GAT GCT CCA CTT ACA AAC TAT CTT AAC GCT CAG TAT
Glu Ala Ser His Asp Ala Pro Leu Thr Asn Tyr Leu Asn Ala Gln Tyr
85 90 95

TTT ACT GAG GTA TCA TTA GGT ACC CCT CCA CAA TCC TTC AAG GTG ATT
Phe Thr Glu Val Ser Leu Gly Thr Pro Gln Ser Phe Lys Val Ile
100 105 110

CTT GAC ACA GGA TCC TCC AAT TTA TGG GTT CCT AGC AAA GAT TGT GGA
Leu Asp Thr Gly Ser Ser Asn Leu Trp Val Pro Ser Lys Asp Cys Gly
115 120 125

TCA TTA GCT TCC TTT TTT CAT GCT AAG TAT GAC CAT GAT GAG TCT TCT
Ser Leu Ala Cys Phe Leu His Ala Lys Tyr Asp His Asp Glu Ser Ser
130 135 140

ACT TAT AAG AAG AAT GGT AGT AGC TTT GAA ATT AGC TAT GGA TCC GGT
Thr Tyr Lys Lys Asn Gly Ser Ser Phe Glu Ile Asn Tyr Gly Ser Gly
145 150 155

TCC ATG GAA GGG TAT GTT TCT CAG GAT CTG TTT GAA ATT GGG GAT TTT
Ser Met Glu Gly Tyr Val Ser Gln Asp Val Leu Gln Ile Gly Asp Leu
160 165 170

ACC ATT CCC AAA GTT GAT TTT CCT GAG GGC ACA TCC GAG CCC GGG TTT
Thr Ile Pro Lys Val Asp Phe Ala Glu Ala Thr Ser Glu Pro Gly Leu
175 180 185

GCC TTC GCT TTT GGC AAA TTT GAC GGA ATT TTT GGG CTT GCT TAT GAT
Ala Phe Ala Phe Gly Lys Phe Asp Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Asp
190 195 200

TCA ATA TCA GTA AAT AAG ATT GTT CCT GCA ATT TAC AAG GCT TTT GAA
Ser Ile Ser Val Asn Lys Ile Val Pro Pro Ile Tyr Lys Ala Leu Glu
205 210 215

TTA GAT CTC CTT GAC GAA CCA AAA TTT GGC TTC TAC TTT GGG GAT ACG
Leu Asp Leu Leu Asp Glu Pro Lys Phe Ala Phe Tyr Leu Gly Asp Thr
220 225 230

GAC AAA CAT GAA TCC GAT GGC GGT TTT GGC ACA TTT GGT GGT GTG GAC
Asp Lys Asp Glu Ser Asp Gly Gly Leu Ala Thr Phe Gly Gly Val Asp
235 240 245

AAA TCT AAG TAT CAA GGA AAG ATC ACC TTT TTT GCT GTC AGA AAG AAG
Lys Ser Lys Tyr Glu Gly Lys Ile Thr Trp Leu Pro Val Arg Arg Lys
250 255 260

GCT TAC TCC GAC GTC TCT TTT GAT GGT GTA GGT TTT GGA TCC GAA TAT
Ala Tyr Trp Glu Val Ser Phe Asp Gly Val Gly Leu Gly Ser Glu Tyr
265 270 275

GCT GAA TTT CAA AAA ACT GCT GCA GGC ATC GAC ACT GGA ACC TCA TTT
Ala Glu Leu Gln Lys Thr Gly Ala Ala Ile Asp Thr Gly Thr Ser Leu
280 285 290

ATT GCT TTT CCC ACT GGC CTA GCT GAA ATT CTT AAT GGA GAA ATT GGT
Ile Ala Leu Pro Ser Gly Leu Ala Glu Ile Leu Asn Ala Glu Ile Gly
305 310 315

GCT ACC AAG GGT TGG TCT GGT CAA TAC GCT GTG GAC TGT GAC ACT AGA
Ala Thr Lys Gly Trp Ser Gly Gln Tyr Ala Val Asp Cys Asp Thr Arg
320 325 330

GAC TCT TTT GCA GAC TTA ACT TTA ACC TTC GGC GGT TAC AAG TTT ACC
Asp Ser Leu Pro Asp Leu Thr Leu Thr Phe Ala Gly Tyr Asn Phe Thr
335 340 345

ATT ACT GCA TAT GAC TAT ACT TTT GAG GGT TCT GGG TCA TGT ATT AGT
Ile Thr Pro Tyr Asp Tyr Thr Leu Glu Val Ser Gly Ser Cys Ile Ser
350 355 360

GCT TTC ACC CCC ATC GAC TTT CTT GAA CCA ATA GGT CTT TTT GCA ATC
Ala Phe Thr Pro Met Asp Phe Pro Glu Pro Ile Gly Pro Leu Ala Ile
365 370 375

ATT GGT GAC TCC TTC TTT AGA AAA TAT TAC TCA CTT TAT GAC GTA GGG
Ile Gly Asp Ser Phe Leu Arg Lys Tyr Tyr Ser Val Tyr Asp Leu Gly
380 385 390

AAA GAT GCA GTA GCT TTA GGC AAG TCT ATT TAGCCAGAA TAAAGTTTC
Lys Asp Ala Val Gly Leu Ala Lys Ser Ile
395 400 405

TCAGCTGAAT TTAATTTGTT ACTATCAGG TAGTGAAGAT GTAGAGATA TATTTTAAAG
1198

TATTTTITTT TACTTTTCT CTTATACCTG ATCTTCAGTA GGTGATTGCT TGTGAGCTAC
1246

GATACAGGC GGCATTAAGT SATATGCTGT ACTGCTCAAT CAGGATTTTC CTGCTGCATT
1284

GATAGGCTA TAAGAGACCC ACTGCTGCTT CTTTAAATTT CTCTTTAAC TGTGCTGAAA
1342

ATCATGTCG AAGCAAAATC GAGTTTAAAT CTATGCGGTT GGTAACTAAA GGTATGTCAT
1390

GCTGCTATAT ACTTTTTCAT TTTAGCTTTT ACTAATCACT TTTAGAGAG AAGAGCTCT
1438

TTCTAAGAT CCAATATAGA CTAATATCTG GAGACCATCG GGTCTTATTT TGGTGAAG
1486

GCAGTGGCT ACAGTAAGGG AAGCATATTC GATGATGAGA GATGCTGCTT CTGCTTTTCC
1534

TTTGAAGCAA TGTCAATTTA GAATTTATCG CTGGGAGAG GATGAGTACT CTGAGTCTC
1582

AGAC
2032

配列番号2:

(1) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 410アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直線状

(B) 配列の種類: タンパク質

(ii) 配列: 配列番号2:

Met Ile Phe Asp Gly Thr Thr Met Ser Ile Ala Ile Gly Leu Leu Ser
1 5 10 15

Thr Leu Gly Ile Gly Ala Glu Ala Lys Val His Ser Ala Lys Ile His
20 25 30

Lys His Pro Val Ser Glu Thr Leu Lys Glu Ala Asn Phe Gly Gln Tyr
35 40 45

Val Ser Ala Leu Glu His Lys Lys Val Ser Leu Phe Asn Glu Gln Asn
50 55 60

Ala Leu Ser Lys Ser Asn Phe Met Ser Gln Gln Asp Gly Phe Ala Val
65 70 75 80

Glu Ala Ser His Asp Ala Pro Leu Thr Asn Tyr Leu Asn Ala Gln Tyr
85 90 95

Phe Thr Glu Val Ser Leu Gly Thr Pro Pro Gln Ser Phe Lys Val Ile
100 105 110

Leu Asp Thr Gly Ser Ser Asn Leu Trp Val Pro Ser Lys Asp Cys Gly
115 120 125

Ser Leu Ala Cys Phe Leu His Ala Lys Tyr Asp His Asp Glu Ser Ser
130 135 140

Thr Tyr Lys Lys Asn Gly Ser Ser Phe Glu Ile Arg Tyr Gly Ser Gly
145 150 155 160

Ser Met Glu Gly Tyr Val Ser Gln Asp Val Leu Gln Ile Gly Asp Leu
165 170 175

Thr Ile Pro Lys Val Asp Phe Ala Glu Ala Thr Ser Glu Pro Gly Leu
180 185 190

Ala Phe Ala Phe Gly Lys Phe Asp Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Asp
195 200 205

Ser Ile Ser Val Asn Lys Ile Val Pro Pro Ile Tyr Lys Ala Leu Glu
210 215 220

Leu Asp Leu Leu Asp Glu Pro Lys Phe Ala Phe Tyr Leu Gly Asp Thr
225 230 235 240

Asp Lys Asp Glu Ser Asp Gly Gly Leu Ala Thr Phe Gly Gly Val Asp
245 250 255

Lys Ser Lys Tyr Glu Gly Lys Ile Thr Trp Leu Pro Val Arg Arg Lys
260 265 270

Ala Tyr Trp Glu Val Ser Phe Asp Gly Val Gly Leu Gly Ser Glu Tyr
275 280 285

Ala Glu Leu Gln Lys Thr Gly Ala Ala Ile Asp Thr Gly Thr Ser Leu
290 295 300

Ile Ala Leu Pro Ser Gly Leu Ala Glu Ile Leu Asn Ala Glu Ile Gly
305 310 315 320

Ala Thr Lys Gly Trp Ser Gly Gln Tyr Ala Val Asp Cys Asp Thr Arg
325 330 335

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Thr Leu Thr Phe Ala Gly Tyr Asn Phe Thr
340 345 350

Ile Thr Pro Tyr Asp Tyr Thr Leu Glu Val Ser Gly Ser Cys Ile Ser
355 360 365

Ala Phe Thr Pro Met Asp Phe Pro Glu Pro Ile Gly Pro Leu Ala Ile
370 375 380

Ile Gly Asp Ser Phe Leu Arg Lys Tyr Tyr Ser Val Tyr Asp Leu Gly
385 390 395 400

Lys Asp Ala Val Gly Leu Ala Lys Ser Ile
405 410

特表平6-506117 (42)

配列番号 3:

(1) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 2888塩基対

(B) 配列の型: 複製

(C) 種の数: 不明

(D) トポロジー: 不明

(E) 配列の種類: cDNA

(ix) 特徴:

(A) 特徴を表す記号: CDS

(B) 存在位置: 643...1431

(ix) 特徴:

(A) 特徴を表す記号: 成熟ペプチド

(B) 存在位置: 643...1431

(xi) 配列: 配列番号 3:

CTCCAGAAAT GGGGAGATTA CCACCTTTGA CGAATTGACT AAGCTCTAC AGATCATGTT 60
TACCAATGCC ATCATCTATA ACGATGAAGA CAGTCATCTT TCGAAGCTAA CGATTGAAT 120
GATGGAAGAA ACTACTAAGA TTATGAGACT GTTCAGAGAA AGCTGAGATT AGCTGAGACT 180
AATGAACTTT ATGTACAAA ATATGGGTTT AACCTCTTAC CTGTTCATC ATAGTTGCT 240
TTTCTTCTT GAAAGTTGA CCACTCTCTT CACTGCTCTT GAGGAACTTT TCTGCACT 300
TCTTGATGCA GCTTCTCTCT TTAGAAGTCA ACTTGTAGCA TGTAAATCA TTGACAGAT 360
CTGTAAACA TTGCTAACC AAATCGGAGT AAGAGCCCAT GAACTCTTTC ATTCTTTT 420
GTTCAGAGAA TTCTGGAAC TGTGTTTCTT CTCTAGGCTT GATGCTGCTT ATTCTTGT 480
GTCTTCTCTT GGGTGAAGT TACGACTTTC TCTCTCTT ACCACTTTT GTCAAGATT 540
AAGAAAAGG TTTTGTGAC GGTACAGCTC GCACCTATGC TTGCAATCA TCCACTCTAA 600
TGCTTAACT TCAAGCTGAT CAAAGGAGTA GATACCTAGA CA ATG GCT GCG AGT 660
Met Ala Arg Ser 1
TAT GCG GAG AGA GCA AAT ACT CAT CAA TCA GCT GTC GCA GCA GCA GTC 702
Tyr Ala Glu Arg Ala Ser Thr His Glu Ser Pro Val Ala Arg Arg Leu 5 10 15 20
TTT GCG CTG ATG GAA CAG AAG CAG AGT AAC CTA TGC GCA TCA GTC GAC 760
Phe Ala Leu Met Glu Gln Lys Glu Ser Asn Leu Cys Ala Ser Val Asp 25 30 35

ATTCAAGTGA ATGATCTTTC AATTTCATGC CTGAATTTT GAGGAGTAT TTCAAGAGG 1521
AGAAAGCCCA GAGATGTTTC TCGAATGATA GTTAAGGCA TCGTAAGGAA CCGTTATTA 1581
AAGCAGGAGG TCGAAGATAG TTGAAGTTC TCAATGAGC TCACCAACTS GTGGAATGTA 1641
TGTAAATGTA ATGAGTAAAT TGAAGGAGAT TTACTTTTCT TATGCAAGGA GTTCTGTTG 1701
AAATATCCA ACGCTTCCAA CTTTCTTAAA TGTATTGACT GAACCTTACA AAAGGAGTAT 1761
TGAAAGGCTA GTAAAGAGCA TCGAGGCTTA CAGCAGGCTA AAAGAAATAA AGTCTCTCT 1821
AGGATATTTT CACTTTTCTT TTGACTGTT TCGACTTGGG GCGTTCTGAG AAGATATTT 1881
TTGATCTTAT CAATCTCTC GATAGTCTTC TCGGTTATCC TGTAACTCTT ATTCTTAAAT 1941
GCTTGAATG TTGTAAGATA TATAGGAGAG GATGCTCTTT CTTTGAAGAG ACTCAAGAG 2001
TAGCAGGCAA ATACCCGCGC AAAGCACTA GTTTTAAAT TATGAGGAG GTAAATGAT 2061
AAGTTTCTAT TCTTCCGCGC AATAATCTG GAGGCAATAG ATCGAGGATA TATTGATCA 2121
ATTGAGGAG GTAGCAATGA CTGCGAGCT CCAGCTAGAA ACCGAGCTG AAATGATCT 2181
ACTAGCTTTT CATTTGCTAT GATGCTGCGC TCTTGAAGCT CACTATATGA CTGCAAGAT 2241
GATAAATACG TTGTAAGAG TACAATCTCC ATCAGAGAT TCGCTACCAA TCGTGGCAG 2301
ACCTGTTTTC GTATGAGCTC CCAAGCACTG GTTTTGAAG CTGCTAACAA TAGAGCTGGA 2361
TTTGAAGTGA AAATGGGCTG TAAAGTTTAC GTTTGAAAT AGCTGCAAGG AAGATGCTTA 2421
TTGAGGCTAT GTAGTCAAAA CCACTGAGAG GAAGCACTTT GCGTGGTCTC GTGAGGTAGA 2481
GTGAACTAAA TTGAGCTAGA ACGCTCTGTA TCGCAGCTGT GAGAGGAGAC ACCACTGAC 2541
TGTCTTCTTT GCTAAGAGTA CCGTTTCTAG AATCATCTTT GTCTTCAATA GCTTTCTGCA 2601
ACACAATGCC AGACTTCTATA GAGGATCAGA GGGCAATGGA GGTCTGCTTA TATGATTTA 2661
TAGGCTATCC GAGCTCTG 2689

GTG AGA ACA ACT AAA GAA TTA TTG GAG CTG CTA GAT AAA TTC GGC CCA 798
Val Arg Thr Thr Lys Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Leu Gly Pro 40 65 80
TTT ATC TGT TTG GCG AAG ACT GAT ATC GAC ATA ATT GAT GAG TTG AAG 846
Phe Ile Cys Leu Ala Lys Thr His Ile Asp Ile Ile Asp Asp Phe Thr 15 60 85
TAT GAT GGA ACT ATT CTG CCT TTA TTG GAA CTA TGA AAG AAA CAC AAG 894
Tyr Asp Gly Thr Ile Leu Pro Leu Leu Glu Leu Ser Lys Lys His Lys 70 75 80
TTT TTA ATT TTG GAG GAC AGA AAG TTT GCT GAT ATA GGC AAC ACT GTC 942
Phe Leu Ile Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ala Asp Ile Gly Asn Thr Val 95 90 95 100
AAG CAT CAA TAT CAA GGA GGT GTC TAC AAG ATT GCA CAA TGC GCA GAT 990
Lys His Glu Tyr Glu Gly Val Tyr Lys Ile Ala Glu Trp Ala Asp 105 110 115
ATT ACA AAT GCT CAT GGT GTC ATT GGT AGT GGA ATT CTA AAG GGT CTA 1038
Ile Thr Asn Ala His Gly Val Ile Gly Ser Gly Ile Val Lys Gly Leu 120 125 130
AAG GAG CCA GCG ACT GAG ACA ACA GAT CAA CCA AGC GGA CTA TTG ATG 1086
Lys Glu Ala Ala Thr Glu Thr Thr Asp Glu Pro Arg Gly Leu Leu Met 135 140 145
TTG GCT GAA CTG TCG TCA AAG GGA TCA ATT GCG CAT GGT AAG TAC ACC 1134
Leu Ala Glu Leu Ser Ser Lys Gly Ser Ile Ala His Gly Lys Tyr Thr 150 155 160
GAA GAA ACT GTA GAA ATT GCA AAA TCA GAC AAG GAA TTC CTC ATT GCG 1182
Glu Glu Thr Val Glu Ile Ala Lys Ser Asp Lys Glu Phe Val Ile Gly 165 170 175 180
TTT ATT GCT GAA AAT TCT ATG GGA GGA CAA GAT GAA GCG TTC GAT TGG 1230
Phe Ile His Glu Ser Met Gly Gly Glu Ser Glu Gly Phe Asp Trp 185 190 195
ATT ATT ATC ACA CCA GCT GTT GGT TTG GAT GAC ACT GGT GAT GGT CTA 1278
Ile Ile Met Thr Pro Gly Val Gly Leu Asp Asp Thr Gly Asp Ala Leu 200 205 210
GCG CAA CAA TAT CAA ACA GTC AGT AAT GCA GTA TTT TCG ACT GCG ACT GAC 1326
Gly Glu Glu Tyr Arg Thr Val Ser Glu Val Phe Ser Thr Gly Thr Asp 215 220 225
ATC ATA ATC GTA GGT GGT GGT TTG TTT GCG AAG GCG ABA CAT CCG TTA 1374
Ile Ile Ile Val Gly Arg Gly Leu Phe Gly Lys Arg Asp Pro Leu 120 125 130 135
AAA GAA GGT CAA GCG TAT AGA AAA GCT GCG TGC GAA GCT TAC CAA AAT 1422
Lys Glu Gly Glu Arg Tyr Arg Lys Ala Gly Trp Glu His Tyr Glu Asn 245 250 255 260
ATT CTG AAG TAAATTAGAA GATGATGAG GCGATCAATT GTTTGGGCG 1471
Ile Leu Arg

配列番号 4:

(1) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 263アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(D) トポロジー: 環状

(E) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号 4:

Met Ala Arg Ser Tyr Ala Glu Arg Ala Asn Thr His Glu Ser Pro Val 1
1 5 10 15
Ala Arg Arg Leu Phe Ala Leu Met Glu Glu Lys Glu Ser Asn Leu Cys 20
20 25 30
Ala Ser Val Asp Val Arg Thr Thr Lys Glu Leu Leu Glu Leu Asp 35
35 40 45
Lys Leu Gly Pro Phe Ile Cys Leu Ala Lys Thr His Ile Asp Ile Ile 50
50 55 60
Asp Asp Phe Thr Tyr Asp Gly Thr Ile Leu Pro Leu Leu Glu Leu Ser 65
65 70 75 80
Lys Lys His Lys Phe Leu Ile Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ala Asp Ile 85
85 90 95
Gly Asn Thr Val Lys His Glu Tyr Glu Gly Gly Val Tyr Lys Ile Ala 100
100 105 110
Glu Trp Ala Asp Ile Thr Asn Ala His Gly Val Ile Gly Ser Gly Ile 115
115 120 125
Val Lys Gly Leu Lys Glu Ala Thr Glu Thr Thr Asp Glu Pro Arg 130
130 135 140
Gly Leu Leu Met Leu Ala Glu Leu Ser Ser Lys Gly Ser Ile Ala His 145
145 150 155 160
Gly Lys Tyr Thr Glu Glu Thr Val Glu Ile Ala Lys Ser Asp Lys Glu 165
165 170 175
Phe Val Ile Gly Phe Ile Ala Glu Asn Ser Met Gly Gly Glu Asp Glu 180
180 185 190
Gly Phe Asp Trp Ile Ile Met Thr Pro Gly Val Gly Leu Asp Asp Thr 195
195 200 205

Gly Asp Ala Leu Gly Gln Gln Tyr Arg Thr Val Ser Gln Val Phe Ser
210 215 220
Thr Gly Thr Asp Ile Ile Ile Val Gly Arg Gly Leu Phe Gly Lys Gly
225 230 235 240
Arg Asp Pro Leu Lys Gly Gly Glu Arg Tyr Arg Lys Ala Gly Trp Glu
245 250 255
Ala Tyr Gln Asn Ile Leu Arg
260

配列番号5:

(i) 配列の特徴:

- (A) 配列の長さ: 555塩基対
(B) 配列の型: 核酸
(C) 種の数: 不明
(D) トポロジー: 不明

(ii) 配列の種類: cDNA

(ix) 特徴:

- (A) 特徴を表す記号: CDS
(B) 存在位置: 3...554

(ix) 特徴:

- (A) 特徴を表す記号: 感染ペプチド
(B) 存在位置: 3...554

(xi) 配列: 配列番号5:

GA ATT CTG CAG GGA AAC GGC CAG GGT ACA CAT TGT GGT GGT ACC ATT 97
Ile Leu Gln Gly Asn Gly His Gly Thr His Cys Ala Gly Thr Ile
1 5 10 15
GCT TCT GAA AGC TAC GGT GTT OCC AAG AAG GCT AAT GTT GTT GGC ATC 98
Ala Ser Glu Ser Tyr Gly Val Ala Lys Lys Ala Asn Val Val Ala Ile
20 25 30
AAG GTC TTG ACA TCT AAT GGT TCT GGT TCG ATG TCA CAT GTT CTG AAG 143
Lys Val Leu Arg Ser Asn Gly Ser Gly Ser Met Ser Asp Val Leu Lys
35 40 45
GCT GTT GAG TAT GGC ACC GAA TCC CAC TTG GAT GCT GTT AAA AAG GGC 191
Gly Val Glu Tyr Ala Thr Gln Ser His Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly
50 55 60

AAC AAG AAA TTT AAG GGC TGT ACC GGT AAC ATG TCA CTG GGT GGT GGT 329
Asn Lys Lys Phe Lys Gly Ser Thr Ala Asn Met Ser Leu Gly Gly Gly
65 70 75
AAA TGT GGT GGT TTG GAC GTT GCA GTC AAT GCT GCT GTT AAG AAT GGT 287
Lys Ser Pro Ala Leu Arg Leu Ala Val Asn Ala Ala Val Lys Asn Gly
80 85 90 95
ATT CAC TTT GGC GTT GCA GCA GGT AAG GAA AAG CAA GAT GCT TGT AAC 335
Ile His Phe Ala Val Ala Gly Asn Glu Asn Gln Asp Ala Cys Asn
100 105 110
ACC TCG CCA GCA GCT GCT GAG AAT GGC ATC ACC GTC GGT GCA TCA ACC 383
Thr Ser Pro Ala Ala Glu Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Ser Thr
115 120 125
TTA TCA GAC GGT AGA GCT TAC TTT TCT AAC TAC GGT AAA TGT GTT GAC 431
Leu Ser Asp Ala Arg Ala Tyr Phe Ser Asn Tyr Gly Lys Cys Val Asp
130 135 140
ATT TTC GCT CCA GCT TTA AAC ATT GTT TCT ACC TAC ACT GGT TCG SAT 479
Ile Phe Ala Pro Gln Leu Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Thr Gly Ser Asp
145 150 155
GAC GCA ACT GCT ACC TTG TGT GGT ACT TCA ATG GGC AAG CCT CAT GTT 527
Asp Ala Thr Ala Thr Leu Ser Gly Thr Met Ala Ser Pro His Val
160 165 170 175
GCA GGC TTG CAT GCA AGC TTG GCA CTG G 595
Ala Gly Leu His Ala Ser Leu Ala Leu
180

配列番号6:

(i) 配列の特徴:

- (A) 配列の長さ: 184アミノ酸
(B) 配列の型: アミノ酸
(D) トポロジー: 直線状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号6:

Ile Leu Gln Gly Asn Gly His Gly Thr His Cys Ala Gly Thr Ile Ala 15
1 5 10
Ser Glu Ser Tyr Gly Val Ala Lys Lys Ala Asn Val Val Ala Ile Lys 20
20 25 30
Val Leu Arg Ser Asn Gly Ser Gly Ser Met Ser Asp Val Leu Lys Gly 35
35 40 45
Val Glu Tyr Ala Thr Gln Ser His Leu Asp Ala Val Lys Lys Gly Asn 50
50 55 60
Lys Lys Phe Lys Gly Ser Thr Ala Asn Met Ser Leu Gly Gly Gly Lys 65
65 70 75 80
Ser Pro Ala Leu Asp Leu Ala Val Asn Ala Ala Val Lys Asn Gly Ile 85
85 90 95
His Phe Ala Val Ala Ala Gly Asn Glu Asn Gln Asp Ala Cys Asn Thr 100
100 105 110
Ser Pro Ala Ala Glu Asn Ala Ile Thr Val Gly Ala Ser Thr Leu 115
115 120 125
Ser Asp Ala Arg Ala Tyr Phe Ser Asn Tyr Gly Lys Cys Val Asp Ile 130
130 135 140
Yhe Ala Pro Gly Leu Asn Ile Leu Ser Thr Tyr Thr Gly Ser Asp Asp 145
145 150 155 160
Ala Thr Ala Thr Leu Ser Gly Thr Ser Met Ala Ser Pro His Val Ala 165
165 170 175
Gly Leu His Ala Ser Leu Ala Leu 180

特許(内容に変更なし)

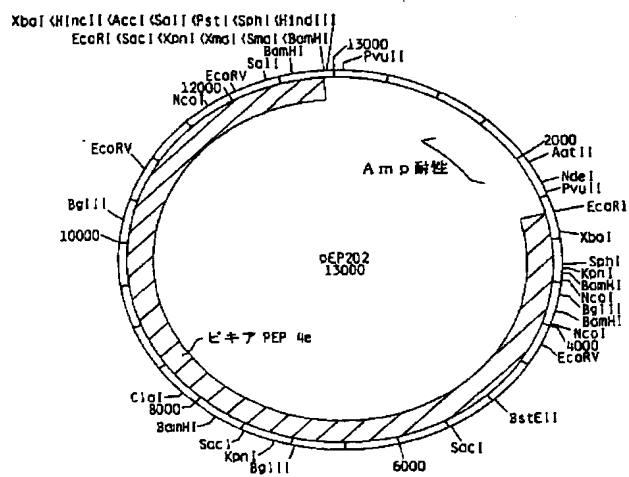


図 1

図 2 pEP202 の近接状況図

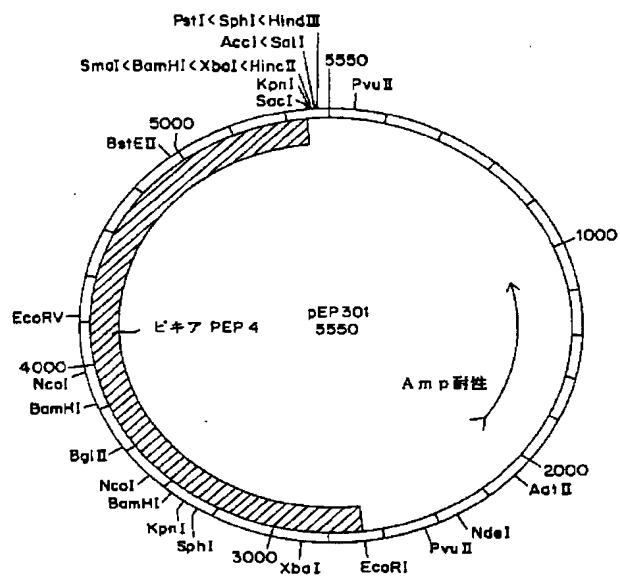
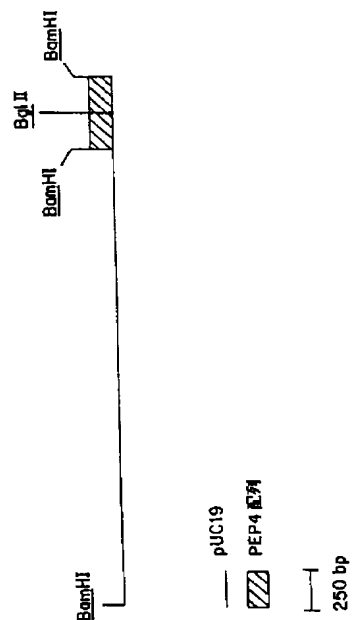


図 3

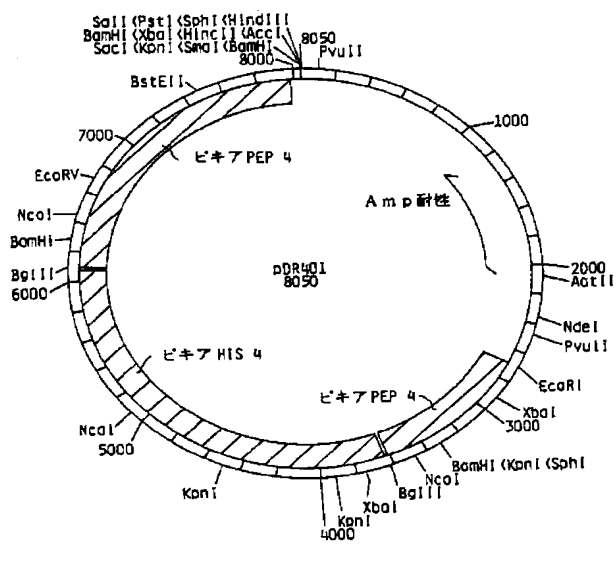


図 4

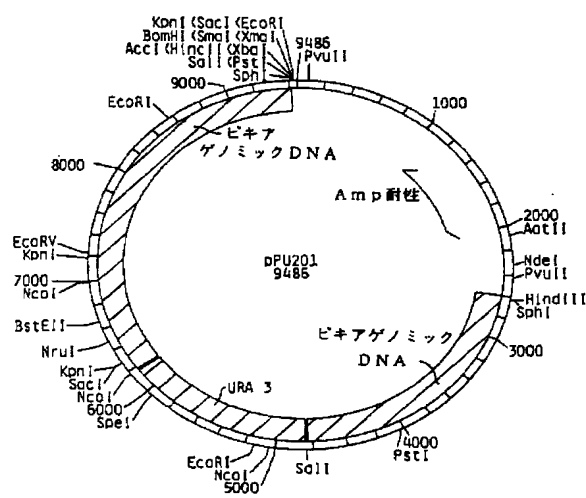
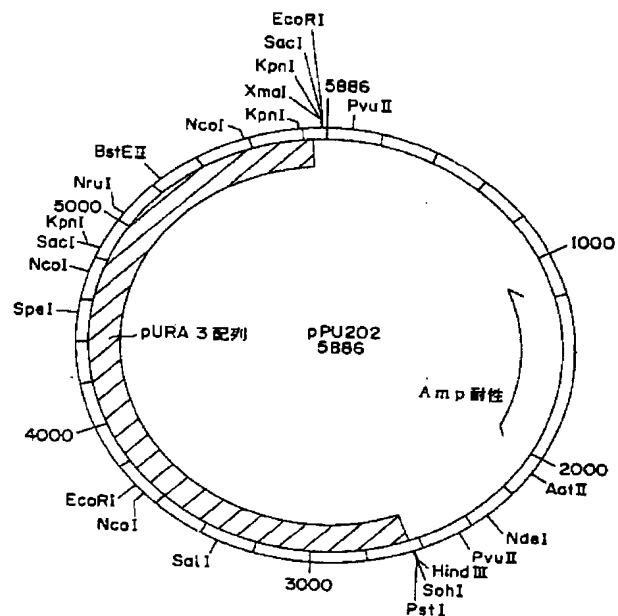
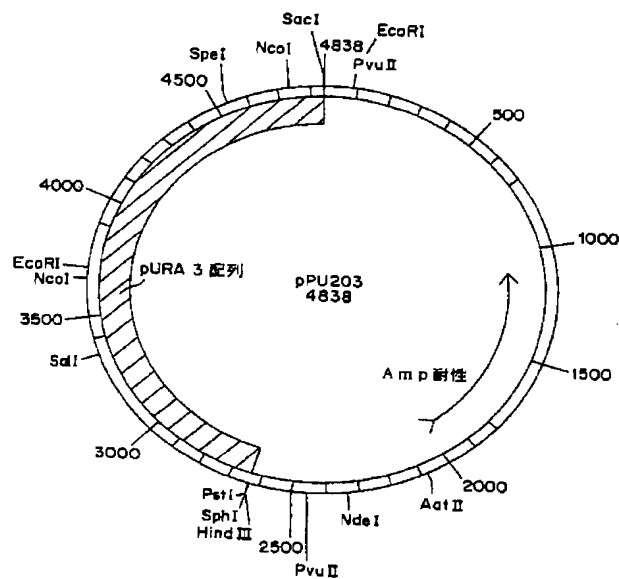


図 5



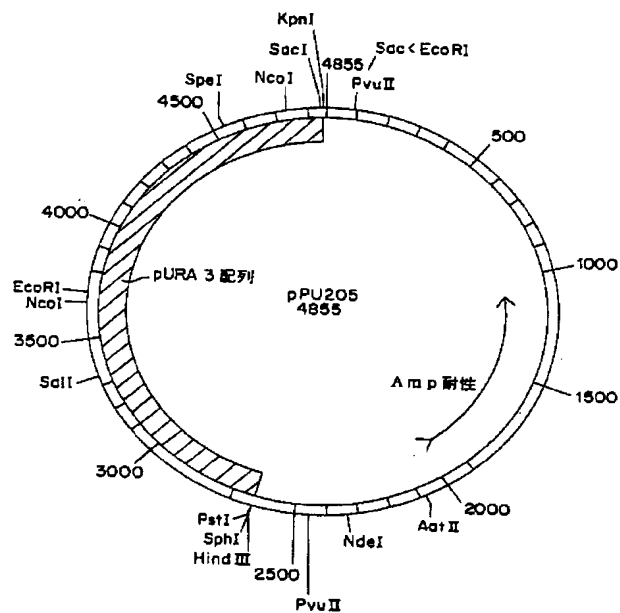
プラスミド地図: pPU202 配列: 1~5886

図 6



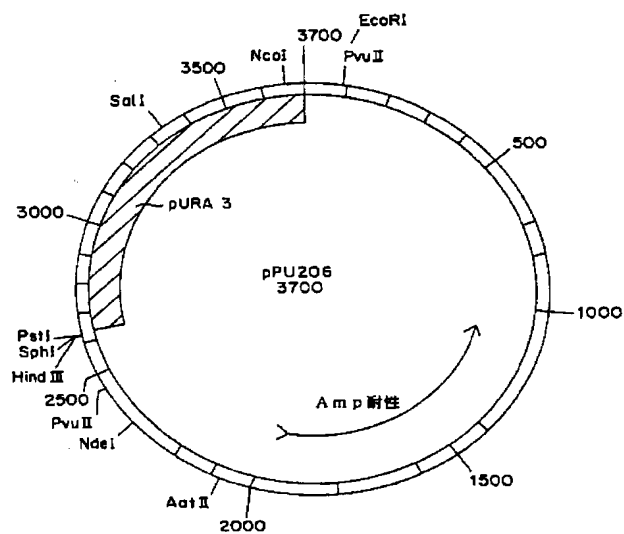
プラスミド地図: pPU203 配列: 1~4838

図 7



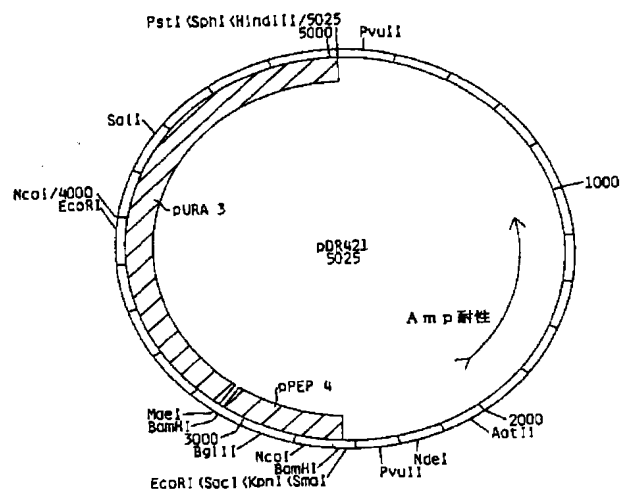
プラスミド地図: pPU205 配列: 1~4855

図 8



プラスミド地図: pPU206 配列: 1~3700

図9



プラスミド地図: pDR421 配列: 1~5025

図10

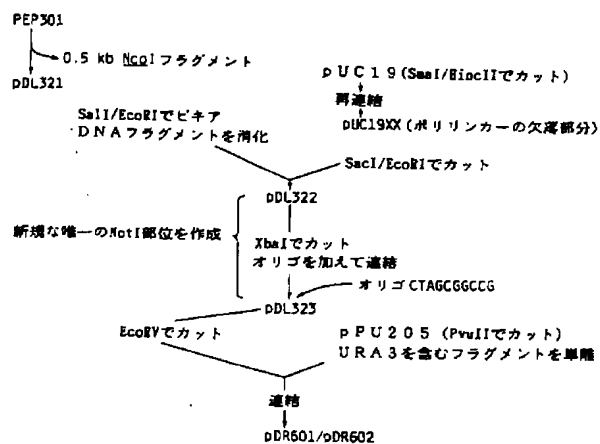
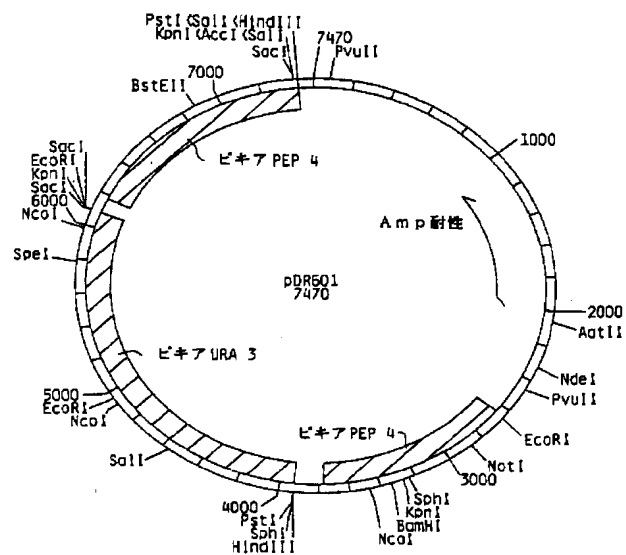


図11



プラスミド地図: pDR601 配列: 1~7470

図12

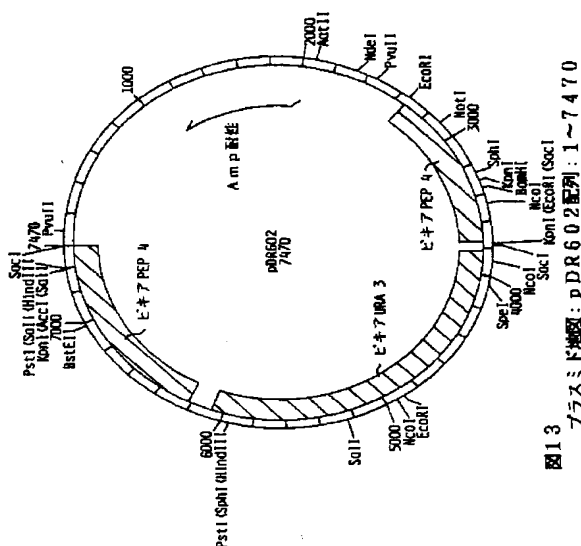


図13
プラスミド地図: pDR602配列: 1~7470

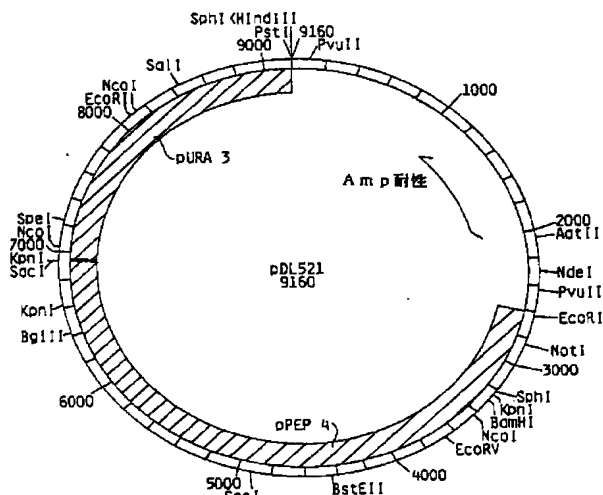


図14
プラスミド地図: pDL521配列: 1~9160

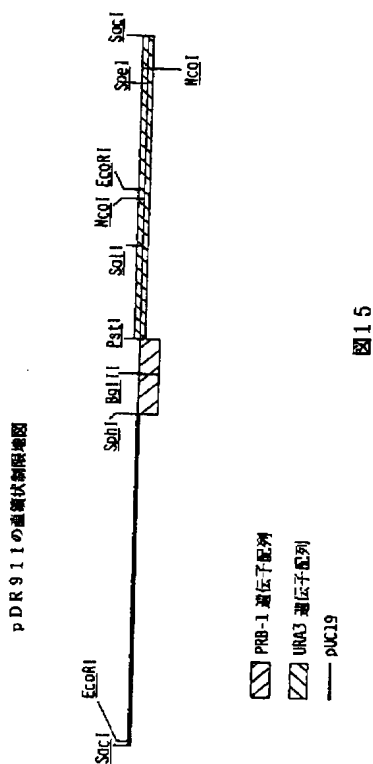


図15

補正書の翻訳文提出書
(特許法第184条の8)

平成 5年 9月14日

特許庁長官 麻生 渡 殿

1. 特許出願の表示

PCT/US92/02521

2. 発明の名称

ピキア (Pichia) 蛋白質分解活性に影響する遺伝子およびその使用

3. 特許出願人

住 所 アメリカ合衆国カリフォルニア州92037, ラ・ホーラ,
ゴースト・ブルヴァード・サウス 505
名 称 ザ・ソーク・インスティテュート・バイオテクノロジー/
インダストリアル・アソシエイツ・インコーポレーテッド

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手町ビル 206区
電 話 3270-6641~6646
氏 名 (2770) 井理士 湯 浅 恭 三

5. 補正書の提出日

平成 5年 6月 6日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の翻訳文

1通



請求の範囲

[請求項1を補正し、請求項2および3を削除し、請求項4〜7を新請求項2〜5とし、請求項8を削除し、請求項9〜15を新請求項6〜12とし、請求項16を補正して新請求項13とし、請求項17を新請求項14とし、請求項18〜20を補正して新請求項15〜17とし、請求項21を新請求項18とし、請求項22〜24を補正して新請求項19〜21とし、請求項25を削除し、請求項26および27を新請求項22および23とし、請求項28を補正して新請求項24とし、請求項29〜31を新請求項25〜27とし、請求項32を補正して新請求項28とし、請求項33〜39を新請求項29〜35とし、請求項40を削除し、請求項41〜48を新請求項36〜43とし、そして新請求項44〜47を加えた。]

1. ビキア属の菌株から得られる単離DNAフラグメントであって、直接又は間接的に前記菌株のタンパク分解活性に影響を及ぼすタンパク質をコードする遺伝子を含み、タンパク質分解活性に影響を及ぼす産物をコードする該遺伝子がビキアPEP4遺伝子またはビキアPRB-1遺伝子である、上記DNAフラグメント。

2. 前記フラグメントがプラスミドpEP202の約1.5kbp EcoRIフラグメントである請求項2記載のDNAフラグメント。

3. 前記フラグメントが、前記菌株のカルボキシペプチダーゼY活性に影響を及ぼすタンパク質をコードする、プラスミドpEP301の約2.7kbp EcoRI-SacIフラグメント又はその部分である請求項2記載のDNAフラグメント。

4. 前記遺伝子の前記核酸配列が配列番号2に記載されるアミノ酸配列と実質的に同じであるアミノ酸配列をコードする請求項2記載のDNAフラグメント。

5. 前記遺伝子の核酸配列が配列番号1に記載される核酸配列と実質的に同じである請求項2記載のDNAフラグメント。

6. 前記遺伝子の改変形が相同的組換えによるビキア属の酵母宿主中への導入に導く請求項1記載のDNAフラグメントであって、その発現産物がタンパク質分解活性に影響を及ぼす前記遺伝子の特定座において相同的組換えが生ずる

17. プロテイナーゼBまたはプロテイナーゼA活性とカルボキシペプチダーゼY活性との欠損した請求項16記載の菌株。

18. P. バストリスの菌株p1、p2、p5、p8、p13、p16又はp20から選択される請求項17記載の菌株。

19. 前記宿主菌株がヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子、アルギニノスクシネート リアーゼ遺伝子、又はオロチジン-5'-ホスフェートデカルボキシラーゼ遺伝子から選択される少なくとも1種の栄養要求性マーカー遺伝子を欠き、前記DNAフラグメントが宿主菌株に欠けている栄養要求性マーカー遺伝子の完全形をコードしている請求項13記載の方法。

20. 請求項19記載の方法によって生成されるタンパク分解活性の欠損したビキア菌株。

21. プロテイナーゼA活性とカルボキシペプチダーゼY活性との欠損した請求項20記載の菌株。

22. 遺伝子の前記フラグメントがそれからの欠失の生成によって改変される請求項13記載の方法。

23. 前記宿主菌株がGS115であり、前記DNAフラグメントがプラスミドpDR401の約5.3kbp SacI-EcoRIフラグメントである請求項19記載の方法。

24. ビキア属の野生型菌株に比べて、タンパク質分解活性の欠損したビキア属の酵母細胞であって、上記タンパク質分解活性がプロテイナーゼBまたはプロテイナーゼAおよびカルボキシペプチダーゼY活性であり、かつ、ビキアのPEP4またはPRB-1遺伝子によりコードされている上記酵母細胞。

25. プロテイナーゼA活性とカルボキシペプチダーゼY活性との欠損した請求項24記載の酵母細胞。

26. タンパク分解感受性組換え産物の発現方法であって、前記産物をコードするDNAによって請求項24記載の細胞を形質転換させ、前記細胞を前記タンパク分解感受性産物が発現されるような条件下で培養することを含む方法。

27. 発現時に、前記宿主生物のカルボキシペプチダーゼY活性に直接又は間接的に影響を及ぼすタンパク質をコードする細胞の遺伝子を、前記宿主菌株の

DNAフラグメント。

7. 改変遺伝子が、その非改変形において、前記菌株のカルボキシペプチダーゼY活性に影響を及ぼすタンパク質をコードする請求項1記載のDNAフラグメント。

8. 前記遺伝子がその中への栄養要求性マーカー遺伝子の挿入によって改変される請求項6記載のDNAフラグメント。

9. 前記栄養要求性マーカー遺伝子がビキアもしくはサッカロミセスHIS4遺伝子、ビキアもしくはサッカロミセスARG4遺伝子、又はビキアもしくはサッカロミセスURA3遺伝子から選択される請求項8記載のDNAフラグメント。

10. 前記フラグメントがプラスミドpDR401中に含まれる請求項9記載のDNAフラグメント。

11. 前記遺伝子がそれからの欠失の生成によって改変される請求項6記載のDNAフラグメント。

12. 前記フラグメントがプラスミドpDR421中に含まれる請求項11記載のDNAフラグメント。

13. ビキア属の宿主菌株に比べて、タンパク分解活性の欠損したビキア属菌株の形成方法であって、前記ビキア宿主菌株を請求項1記載のDNAフラグメントと、前記宿主菌株のゲノム中に前記DNAフラグメントを部位特異的に組み込んだ条件下で接合させることを含む、方法。

14. 前記接合の結果として得られる菌株を、前記宿主菌株に比べて低いタンパク分解活性を有する菌株の存在に関して検査する工程と；

前記宿主菌株に比べて低いタンパク分解活性を有するような菌株を選択する工程と

をさらに含む請求項13記載の方法。

15. 前記DNAフラグメントの組込みが前記宿主生物のプロテイナーゼA活性とカルボキシペプチダーゼY活性に変化をもたらす請求項13記載の方法。

16. タンパク質分解活性が欠損しており、かつ、請求項13記載の方法によって形成されるタンパク分解活性の欠損したビキア菌株。

栄養要求性表現型を補足するマーカー遺伝子の挿入によって改変される前記遺伝子の欠失形によって組換えることによって、細胞のタンパク分解活性を欠損させる；かつマーカー遺伝子をヒスチジノールデヒドロゲナーゼ遺伝子、アルギニノスクシネート リアーゼ遺伝子、又はオロチジン-5'-ホスフェートデカルボキシラーゼ遺伝子から選択する請求項28記載の方法。

28. 下記宿主菌株のゲノム中に下記DNAフラグメントを部位特異的に組み込むのに適した条件下で、ビキア属のタンパク質分解活性に影響を及ぼす産物をコードする遺伝子の修飾形を含むDNAフラグメントにビキア宿主菌株を接合させることによりタンパク質分解活性を欠損する宿主菌株を作成し；そして

タンパク質分解に感受性の産物を発現させる条件下で、タンパク質分解活性の欠損した、上記宿主菌株を培養する

工程よりなるが、その際、上記タンパク質分解活性に影響を及ぼす産物をコードする遺伝子がビキアPEP4遺伝子またはビキアPRB-1遺伝子であって；

上記少なくとも1種の栄養要求性マーカー遺伝子を欠き、かつ前記宿主菌株が転写の読み取りフレーム方向において、下記ヌクレオチド配列；

(i) メチロトロフ酵母のメタノール反応性遺伝子のプロモーター領域；

(ii) 本質的に、

(a) 任意の分岐シグナル配列と、

(b) タンパク分解感受性タンパク質と

から成るポリペプチドをコードする配列と、

(iii) メチロトロフ酵母中の機能的転写終結因子と、

を有する発現カセットを含む少なくとも1個のDNAフラグメントによって形質転換され、前記配列が前記ポリペプチドをコードする配列の転写に関して作用的に連絡されている、上記方法。

29. 前記宿主菌株が少なくとも2種の栄養要求性マーカー遺伝子を欠損する請求項28記載の方法。

30. 前記栄養要求性マーカー遺伝子がHIS4遺伝子とURA3遺伝子である請求項29記載の方法。

31. タンパク分解感受性産物がIGF-1であり、IGF-1をコードす

るDNAによる前記宿主の形質転換に用いられるマーカー遺伝子がHIS4遺伝子である請求項30記載の方法。

32. 宿主をタンパク分解活性欠損にさせるために用いられる改質遺伝子が、その発現形において、宿主のカルボキシペプチダーゼ活性に影響を及ぼすタンパク質をコードする請求項31記載の方法。

33. 改質遺伝子がコード配列の一部の欠失によって形成される請求項32記載の方法。

34. 前記組換え産物を発現する組換え菌株が菌株M+1MB206S1である請求項33記載の方法。

35. ピキア属の種からのオルチジン-5'-ホスフェートデカルボキシラーゼ遺伝子を含む単離DNAフラグメント。

36. 前記遺伝子が配列番号4に記載した配列と実質的に同じアミノ酸配列をコードする請求項35記載のDNAフラグメント。

37. 前記遺伝子が配列番号3に記載した配列と実質的に同じ核酸配列を有する請求項35記載のDNAフラグメント。

38. オルチジン-5'-ホスフェートデカルボキシラーゼ遺伝子の欠損したピキア属の酵母細胞。

39. 前記酵母細胞がピキア パストリスの菌株である請求項38記載の酵母細胞。

40. 前記酵母細胞が菌株ピキア パストリスGS4-2である請求項39記載の酵母細胞。

41. さらにタンパク分解活性欠損を含む請求項38記載の酵母細胞。

42. プロテイナーゼA活性とカルボキシペプチダーゼY活性との欠損した請求項41記載の酵母細胞。

43. ピキア パストリス菌株GS4-2521-3/7又はGS4-2521-4/1から選択される請求項42記載の酵母細胞。

44. 上記得られた株がピキア PEP4遺伝子およびピキア PRB-1により影響されるタンパク質分解活性に欠損を有するものである。請求項13記載の方法。

45. プロテイナーゼB、プロテイナーゼA活性およびカルボキシペプチダーゼY活性が欠損した請求項44記載の酵母細胞。

46. 上記遺伝子がピキア PEP4遺伝子である、請求項1記載のDNAフラグメント。

47. 上記遺伝子がピキア PRB-1遺伝子である、請求項1記載のDNAフラグメント。

手 続 補 正 書

平成 5年12月27日

特許庁長官 麻生 渡 殿

1. 事件の表示

PCT/US92/02521
平成4年特許願第509369号

2. 発明の名称

ピキア (Pichia) 蛋白質分解活性に影響する遺伝子
およびその使用

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 アメリカ合衆国カリフォルニア州92037,
ラ・ホーラ, コースト・ブールヴァード・サウス
505

名 称 ザ・ソーク・インスティテュート・
バイオテクノロジー/インダストリアル・
アソシエイツ・インコーポレーテッド

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手町ビル 206区
電 話 3270-8641~6

氏 名 (2770) 弁理士 湯 浅 恭

5. 補正の対象

- (1) 出願人の代表者名を記載した国内書面
- (2) 委任状及び翻訳文
- (3) 図面翻訳文

6. 補正の内容

別紙の通り(尚、上記(3)の書面の内容には変更なし)



手 続 補 正 書

平成 5年12月27日

特許庁長官 麻生 渡 殿

1. 事件の表示

PCT/US92/02521
平成4年特許願第509369号

2. 発明の名称

ピキア (Pichia) 蛋白質分解活性に影響する遺伝子
およびその使用

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 アメリカ合衆国カリフォルニア州92037,
ラ・ホーラ, コースト・ブールヴァード・サウス
505

名 称 ザ・ソーク・インスティテュート・
バイオテクノロジー/インダストリアル・
アソシエイツ・インコーポレーテッド

4. 代 理 人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手町ビル 206区
電 話 3270-8641~6

氏 名 (2770) 弁理士 湯 浅 恭

5. 補正の対象

平成5年9月14日付提出の補正書の翻訳文提出書の
図面翻訳文

6. 補正の内容

別紙の通り(尚、上記書面の内容には変更なし)



国際調査報告

PCT/US 92/02521

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER According to International Patent Classification (IPC) or its latest modified Classification and IPC Int. Cl. 5 C12N15/81; C12N15/87; C12N15/53; C12N15/60 C12N1/19; C07K33/00										
II. FIELD OF INVENTION International Classification of Inventions Classification Scheme Int. Cl. 5 C12N										
Documents considered relevant to the International Search Report to the extent that such documents are indicated in the Field of Invention										
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category</th> <th>Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Reference to Class No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>EP, A, 0 336 056 (M & D RESEARCH CO) 11 October 1989 see page 1, last paragraph - page 2: claim 2</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 106, 1987, Columbus, Ohio, US; abstract no. 48594. C. NELSON AND T. YOUNG: 'Yeast intracellular proteolytic enzymes for chill-proofing beer' page 505: column 1: see abstract & J. INST. BREW. vol. 96, no. 6, 1989, pages 599 - 603; ---</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>		Category	Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Reference to Class No.	A	EP, A, 0 336 056 (M & D RESEARCH CO) 11 October 1989 see page 1, last paragraph - page 2: claim 2	1	A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 106, 1987, Columbus, Ohio, US; abstract no. 48594. C. NELSON AND T. YOUNG: 'Yeast intracellular proteolytic enzymes for chill-proofing beer' page 505: column 1: see abstract & J. INST. BREW. vol. 96, no. 6, 1989, pages 599 - 603; ---	1
Category	Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Reference to Class No.								
A	EP, A, 0 336 056 (M & D RESEARCH CO) 11 October 1989 see page 1, last paragraph - page 2: claim 2	1								
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 106, 1987, Columbus, Ohio, US; abstract no. 48594. C. NELSON AND T. YOUNG: 'Yeast intracellular proteolytic enzymes for chill-proofing beer' page 505: column 1: see abstract & J. INST. BREW. vol. 96, no. 6, 1989, pages 599 - 603; ---	1								
* Special categories of cited documents (1) "A" Document defining the general state of the art which is not intended to be a particular invention "B" Document not published in any other form "C" Document which may have been known to the public but which is not intended to be a particular invention "D" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "E" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "F" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "G" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "H" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "I" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "J" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "K" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "L" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "M" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "N" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "O" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "P" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "Q" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "R" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "S" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "T" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "U" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "V" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "W" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "X" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "Y" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention "Z" Document which is not intended to be a particular invention but which is intended to be a particular invention										
IV. CERTIFICATION Date of the Annual Conference of the International Search 11 AUGUST 1992 Date of Meeting of the International Search Board 20. 08. 92 International Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE Signature of Searching Officer VAN DER SCHAL C.A.										

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 1989)

International Application No. PCT/US 92/02521

Category	Character of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Reference to Class No.
A	EP, A, 0 390 876 (TRANSGENE S.A.) 3 October 1990 see the whole document	6, 9, 11, 12, 14, 16, 17, 19, 22, 23, 26, 28-30
A	BIO TECHNOLOGY vol. 7, no. 2, February 1989, NEW YORK US pages 160 - 164; H. DIGNAN ET AL: 'Continuous production of a novel lysozyme via secretion from the yeast, Pichia pastoris' see the whole document	32
A	WO, A, 9 009 449 (HENKEL RESEARCH CORPORATION) 23 August 1990 see abstract; claims	22, 31, 32, 34, 39-48
A	GENE. vol. 29, 1984, AMSTERDAM NL pages 113 - 124; H. ROSE: 'Structure and function of the yeast URAS genes: expression in Escherichia coli' see the whole document	39
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY vol. 6, no. 7, July 1986, WASHINGTON, US pages 2490 - 2499; G. AMMERER ET AL: 'PEP4 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes Proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors' see abstract; figure 2	2, 5, 10, 18, 20, 24, 29, 31, 36, 47

Form PCT/ISA/210 (second sheet) January 1989

国際調査報告

US 9202521
SA 59408

This report was prepared by the International Search Authority (ISA) in accordance with the provisions of the International Patent Cooperation Treaty (PCT) and the Rules of the ISA. The ISA is not responsible for the accuracy or completeness of the information contained in this report. The ISA is not responsible for the accuracy or completeness of the information contained in this report. The ISA is not responsible for the accuracy or completeness of the information contained in this report.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family number(s)	Publication date
EP-A-0336056	11-10-89	JP-A- 1191643 JP-A- 2049885 US-A- 5053333	01-08-89 19-02-90 01-10-91
EP-A-0390676	03-10-90	FR-A- 2645175 CA-A- 2013240 JP-A- 3072868	05-10-90 30-09-90 28-03-91
WO-A-9009449	23-08-90	EP-A- 0487852	27-11-91

For more details about this report, see Official Journal of the European Patent Office, No. 11/92

フロントページの続き

(51) Int. Cl. *	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/60			
15/81			
//(C 1 2 N 1/19			
C 1 2 R 1:84)			

(72) 発明者 ハワード, ブラッドレー・ドレイク
 アメリカ合衆国カリフォルニア州92109,
 サン・ディエゴ, グランド・アベニュー
 1361, ナンバー10